

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



Desenvolvimento de anticorpos bi-específicos para o tratamento do VIH-1

Isa Soraia Batista Moutinho

Mestrado em Biologia Molecular e Genética

Dissertação orientada por:
Doutor Frederico Aires da Silva
Professora Doutora Margarida Telhada

Agradecimentos

“A persistência é o caminho do êxito.” Charles Chaplin

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ainda ninguém pensou sobre aquilo que toda a gente vê.” Arthur Schopenhauer

Na realização desta dissertação de mestrado, contei com o apoio de várias pessoas às quais estou profundamente grata. Deixo assim os meus agradecimentos:

- Ao Doutor Frederico Aires da Silva, meu orientador, pela oportunidade, por todo o apoio, partilha de conhecimentos, palavras de incentivo e toda a confiança em mim depositada.
- À Profª Doutora Margarida Telhada, minha co-orientadora, por toda a disponibilidade e apoio prestado.
- À equipa FAS por ter contribuído para o meu crescimento, não só ao nível profissional, mas também pessoal. Obrigada pela forma como me receberam, pelo bom ambiente em que me proporcionaram trabalhar e por todo o apoio ao longo destes meses. A ti Ana, faço um agradecimento especial. Foste incansável! Obrigada por tudo o que me ensinaste e pela motivação que me deste desde o início ao fim. Obrigada... por tudo.
- A ti Inês, obrigada por toda a paciência e compreensão. Obrigada por me ouvires, por me aconselhares, por teres sempre uma palavra de incentivo para me dar quando me sentia perdida. Sem ti tudo teria sido mais difícil.
- A ti Débora, obrigada pela tua amizade. Agradeço-te por todo o apoio que me deste ao longo destes últimos anos, pela tua infinita disponibilidade, por todas as conversas, toda a preocupação e por acreditares em mim mesmo quando eu duvidei.
- A ti João, obrigada por todo o carinho e toda a compreensão. Obrigada por estares sempre ao meu lado e caminhares comigo na conquista dos meus sonhos.
- A ti Leonardo, que embora ainda não compreendas bem o que tudo isto implica me dizias sempre “Mana, tu consegues, tu és a melhor”.
- Por último, aos meus pais, um obrigado pelo apoio incondicional. Mesmo estando longe, acompanharam todos os passos desta longa caminhada e atrevo-me mesmo a dizer que lutaram comigo. Obrigada por toda a preocupação, todos os conselhos... obrigada por acreditarem sempre em mim. Para vocês faltam-me as palavras. Sem vocês nada disto teria sido possível.

Resumo

O Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), um retrovírus pertencente ao género lentivírus, tem como alvo vários constituintes do sistema imunológico (SI), destruindo ou prejudicando a sua função. A longo prazo, o enfraquecimento progressivo da resposta imune possibilita o aparecimento de infeções oportunistas potencialmente letais (quadro clínico característico da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – SIDA). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), desde a sua identificação até ao ano de 2018, contabiliza-se um total de cerca de 75 milhões de pessoas infetadas pelo VIH e 32 milhões de mortes a ele associadas, fazendo do VIH/SIDA uma das maiores pandemias da história.

A implementação da terapia antirretroviral (TAR) revolucionou a gestão da infeção por VIH. A utilização simultânea de vários agentes antirretrovirais (terapia antirretroviral combinada – TARc), tem sido altamente eficaz na redução da viremia e no atraso da progressão da infeção. A TARc faz uso de um conjunto de fármacos, que ao visarem essencialmente as enzimas virais, têm a capacidade de interromper o processo replicativo do vírus. Todavia, apesar dos benefícios conseguidos pela TARc, o elevado grau de variabilidade genética do VIH favorece o aparecimento de formas virais resistentes o que compromete o estabelecimento de uma terapêutica eficaz a longo prazo. Por essa razão, é necessário encontrar potenciais novos alvos para intervenção. Assim, nos últimos anos, o processo de entrada do vírus na célula alvo tem sido bastante explorado. Alguns componentes virais intervenientes neste processo, em particular a glicoproteína gp120, parece constituir um alvo altamente promissor.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo selecionar anticorpos específicos para a glicoproteína gp120. Para tal, foi construída uma biblioteca imunizada de anticorpos de coelho, a qual permitiu a seleção por *Phage Display* de um conjunto de anticorpos específicos para esta glicoproteína. Em seguida, os diferentes anticorpos selecionados foram testados relativamente à sua capacidade de expressão e ligação à molécula alvo.

Em resumo, os resultados obtidos nesta dissertação sugerem que os anticorpos selecionados poderão constituir uma abordagem bastante promissora para o desenvolvimento de novas moléculas antirretrovirais. Além disso, poderão ser igualmente úteis no mapeamento de epítomos da glicoproteína gp120.

Palavras chave: Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH), gp120, Bibliotecas de Anticorpos, *Phage Display*.

Abstract

Human Immunodeficiency Virus (HIV), a retrovirus belonging to the lentivirus genus, targets several constituents of the immune system (IS), destroying or impairing its function. In the long term, the progressive weakening of the immune response enables the emergence of potentially lethal opportunistic infections characteristic of the clinical picture of Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS). According to the World Health Organization (WHO), since its identification until 2018, about 75 million people have been infected with HIV and 32 million associated deaths, making HIV/AIDS one of the greatest pandemics in history.

Implementation of antiretroviral therapy (ART) has revolutionized the management of HIV infection. Simultaneous use of several antiretroviral agents (combined antiretroviral therapy - cART) has been highly effective in reducing viremia and delaying the progression of the infection. cART uses a range of drugs, with the ability to disrupt the virus replicative process by targeting essentially viral enzymes. However, despite the benefits of cART, the high degree of genetic variability in HIV favors the emergence of resistant viral forms, compromising the establishment of long-term effective therapy, making it necessary to find potential new targets for intervention. In recent years, the virus entry process into the target cell has been widely explored. Some viral components involved in this process, in particular gp120 glycoprotein, appear to be a highly promising field.

In this context, this study aimed to select recombinant antibodies specific for the glycoprotein gp120. To do this, an immunized rabbit antibody library was constructed and used to select by Phage Display a panel of antibodies specific for this glycoprotein. Then, the different antibodies selected were tested for their ability to express and bind to the target molecule.

In summary, the results obtained in this dissertation suggest that the selected antibodies may be a very promising approach for the development of new antiretroviral molecules. In addition, they may also be useful in mapping gp120 glycoprotein epitopes.

Keywords: Human Immunodeficiency Virus (HIV), gp120, Antibodies Libraries, *Phage Display*.

Índice

Agradecimentos.....	I
Resumo.....	II
Abstract	III
Lista de tabelas	VI
Lista de figuras	VII
Lista de abreviaturas.....	IX
1. Introdução.....	1
1.1. O Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH).....	1
1.1.1. Origem e diversidade do VIH.....	1
1.1.2. Estrutura e organização genómica	2
1.1.3. Ciclo de replicação e principais células alvo	3
1.1.4. Terapêuticas atuais e emergentes	4
1.1.5. Os inibidores de entrada	5
1.2. A Glicoproteína Gp120.....	7
1.2.1. Organização estrutural da gp120	7
1.2.2. A gp120 como alvo terapêutico.....	7
1.3. Anticorpos	8
1.3.1. Características e propriedades dos anticorpos	8
1.3.2. Fragmentos de anticorpos.....	9
1.4. Produção e seleção de anticorpos recombinantes	10
1.4.1. Tecnologia de hibridoma	10
1.4.2. Tecnologia de <i>Phage Display</i>	10
1.5. Objetivo	12
2. Materiais e Métodos	13
2.1. Construção da biblioteca de anticorpos (scFv)	13
2.1.1. Amplificação por PCR dos genes que codificam para os domínios VH e VL dos anticorpos (1ª ronda de PCR).....	13
2.1.2. Purificação dos produtos de PCR	14
2.1.3. Precipitação dos produtos de PCR.....	14
2.1.4. Amplificação por PCR para ligação dos domínios VH e VL e construção do scFv (2ª ronda de PCR).....	14
2.1.5. Hidrólise do vetor de DNA e dos produtos da 2ª ronda de PCR com a endonuclease de restrição SfiI.....	15
2.2. Bibliotecas <i>Phage Display</i>	15
2.2.1. Clonagem dos produtos de PCR no vetor pComb3X-SS	15

2.2.2.	Confirmação da eficiência de inserção da biblioteca.....	16
2.2.3.	Seleção de anticorpos específicos para a glicoproteína gp120	16
2.3.	Caracterização dos anticorpos anti-gp120 obtidos e determinação da diversidade das bibliotecas imunizadas VH e VL.....	17
2.4.	Ensaio de expressão e ligação à proteína alvo	18
2.4.1.	Avaliação da expressão e ligação à proteína alvo por meio de ELISA	18
2.4.2.	Avaliação da expressão dos diferentes clones selecionados por meio de <i>Western Blot</i>	19
3.	Resultados e discussão.....	19
3.1.	Construção da biblioteca de anticorpos (scFv)	19
3.1.1.	Amplificação por PCR dos genes que codificam para os domínios VH e VL dos anticorpos (1ª ronda de PCR).....	19
3.1.2.	Purificação dos produtos de PCR (1ª ronda)	20
3.1.3.	Amplificação por PCR para ligação dos domínios VH e VL e construção do scFv (2ª ronda de PCR).....	22
3.1.4.	Purificação dos produtos de PCR (2ª Ronda)	22
3.2.	Bibliotecas <i>Phage Display</i>	23
3.2.1.	Clonagem dos produtos de PCR no vetor pComb3X-SS	23
3.2.2.	Seleção de anticorpos de elevada especificidade para a glicoproteína gp120 por <i>Phage Display</i>	24
3.3.	Caracterização dos sdAbs anti-gp120.....	25
3.4.	Determinação da diversidade das bibliotecas imunizadas VH e VL	26
3.5.	Ensaio de expressão e ligação à proteína alvo	27
3.5.1.	Avaliação da expressão e ligação à proteína alvo por meio de ELISA	27
3.5.2.	Avaliação da expressão dos diferentes clones selecionados por meio de <i>Western Blot</i>	28
4.	Conclusões e perspectivas futuras	28
5.	Referências Bibliográficas	30
6.	Material Suplementar.....	34

Lista de tabelas

Tabela 1.1 - Cinco classes principais de fármacos em uso corrente.	5
Tabela 2.1 - Condições utilizadas nos diferentes ciclos de seleção.	17
Tabela 3.1 – Volumes finais (μl) obtidos após amplificação das diferentes famílias dos domínios VH e quantidade de DNA recuperada após a purificação (ng).	21
Tabela 3.2 – Volumes finais (μl) obtidos após amplificação das diferentes famílias dos domínios VL e quantidade de DNA recuperada após a purificação (ng).	22
Tabela 3.3 – Valores obtidos para o <i>INPUT</i> e <i>OUTPUT</i> nos diferentes ciclos de seleção para as bibliotecas imunizadas VH e VL.	25
Tabela Suplementar 6.1 – Primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> usados na primeira ronda de PCR para amplificação das diferentes famílias dos domínios VH.	35
Tabela Suplementar 6.2 – Primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> usados na primeira ronda de PCR para amplificação das diferentes famílias dos domínios VL.	36
Tabela Suplementar 6.3 – Primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> usados na segunda ronda de PCR.	36

Lista de figuras

Figura 1.1 – A) Subdivisão dos vários grupos, subtipos e sub-subtipos de VIH-1 e VIH-2; B) Prevalência do VIH a nível mundial.	1
Figura 1.2 – Estrutura e organização do genoma do VIH-1 e VIH-2.	3
Figura 1.3 – Representação esquemática do virião VIH-1.....	3
Figura 1.4 – Representação esquemática do ciclo de replicação do VIH.....	4
Figura 1.5 – Estrutura tridimensional da glicoproteína gp120 aquando da ligação a CD4.	7
Figura 1.6 – Representação esquemática da estrutura de um anticorpo (IgG).	9
Figura 1.7 – Diferentes fragmentos de anticorpos	10
Figura 1.8 – Representação esquemática do processo inerente à tecnologia de <i>Phage Display</i>	12
Figura 1.9 – Metodologia seguida no presente trabalho para o desenvolvimento de anticorpos recombinantes.....	13
Figura 2.1 – Combinações de primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> usados para amplificação das diferentes famílias dos domínios VH e VL.....	14
Figura 2.2 – Representação esquemática relativa à construção da biblioteca imunizada scFv..	15
Figura 3.1 – Amplificação por PCR dos genes que codificam para as diferentes famílias dos domínios VH e VL.....	20
Figura 3.2 – Géis de agarose a 2% referentes à purificação dos fragmentos correspondentes às famílias VH1 e VH2 dos domínios VH.....	20
Figura 3.3 – Géis de agarose a 2% referentes à purificação dos fragmentos correspondentes às famílias VH3 e VH4 dos domínios VH.....	20
Figura 3.4 – Géis de agarose a 2% referentes à purificação dos fragmentos correspondentes às famílias K1 e K2 dos domínios VL.....	21
Figura 3.5 – Géis de agarose a 2% referentes à purificação dos fragmentos correspondentes às famílias K3 e Lambda dos domínios VL.....	21
Figura 3.6 – Gel de agarose 1,5% referente à amplificação por PCR para ligação dos domínios VH e VL e construção do scFv.	22
Figura 3.7 – Gel de agarose a 1,5% referente à purificação do scFv.	23
Figura 3.8 – Gel de agarose a 1,5% referente à purificação do scFv após hidrólise com a endonuclease de restrição SfiI.....	23
Figura 3.9 – Gel de agarose 0,8% da purificação do vetor pComb3X-SS após hidrólise com enzima de restrição SfiI..	23
Figura 3.10 – Gel de agarose a 1,5% com os produtos de PCR resultantes da amplificação dos <i>inserts</i> clonados	24
Figura 3.11 – Relação <i>INPUT</i> e <i>OUTPUT</i> nos três ciclos efetuados para a seleção de domínios de anticorpos VH e VL específicos para a glicoproteína gp120	25
Figura 3.12 – Diferentes sequências dos vários clones selecionados após o <i>Phage Display</i> e construção da respetiva árvore filogenética.	26
Figura 3.13 - Representação gráfica da diversidade das bibliotecas imunizadas de anticorpos de coelho.....	27
Figura 3.14 – Avaliação da capacidade de ligação dos clones selecionados à glicoproteína gp120.....	27
Figura 3.15 - <i>Western Blot</i> relativo à expressão dos clones selecionados.....	28
Figura Suplementar 6.1 – Representação esquemática do genoma e proteoma do VIH-1	34
Figura Suplementar 6.2 – A) Representação esquemática dos domínios constituintes da glicoproteína gp41 B) Esquema representativo do processo de fusão entre a membrana viral e a membrana da célula alvo..	34
Figura Suplementar 6.3 – Detalhes do vetor fagemídeo pComb3XSS.	35

Figura Suplementar 6.4 – Expressão dos diferentes clones a uma temperatura de indução de 19°C.....37

Lista de abreviaturas

ABTS – 2,2'-azino-bis (3- ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)

Anti-HA-HRP – Anticorpo *anti-hemagglutinin-horseradish peroxidase*

bNAbs – Anticorpos amplamente neutralizantes

BSA - *Bovine Serum Albumin*

CA – Cápside estrutural

CCR5 – Co-receptor CCR5

cDNA – DNA complementar

CDR – *Complementarity Determining Regions*

CH – Domínio constante da cadeia pesada de um anticorpo

CHR – *C-terminal Heptad Repeat*

CL – Domínio constante da cadeia leve de um anticorpo

CXCR4 – Co-receptor celular CXCR4

DNA – *deoxyribonucleic acid*

dsDNA - double-stranded DNA

DO – Densidade ótica

E. coli – *Escherichia coli*

ELISA - *Enzyme-linked immunosorbent assay*

env – *envelope gene*

ENV – Glicoproteína do envelope viral

Fab - *Fragment antigen binding*

FDA – *Food and Drug Administration*

FP – Péptido de fusão

FR – *Frameworks*

gag - *group-specific antigen gene*

HDAC – Inibidores de histona desacetilase

IgG – Imunoglobulina G

IN – Integrase

IPTG - *Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside*

LTRs - *Long terminal repeats*

MA – Matriz

MHC – Complexo major de histocompatibilidade

MPER – *Membrane-Proximal External Region*

mRNA – RNA mensageiro

NC – Cápside nuclear

Nef - *negative regulating factor*

NGS – *Next generation sequencing*

NHR - *N-terminal Heptad Repeat*

NNRTI – Não-nucleósidos inibidores da transcriptase reversa

NRTI – Nucleósidos inibidores da transcriptase reversa

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS - *Phosphate Buffered Saline*

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

PEG – Polietilenoglicol

PEG-8000 – Polietilenoglicol 8000

PI – Inibidores da protease

PIC – Complexo de pré-integração

pol – *polymerase gene*

PR – Protease

Rev - *RNA-splicing-regulator*

RNA - *Ribonucleic acid*

rpm – Rotações por minuto

RT – Transcriptase reversa

SB – Meio *Super Broth*

scFv - *Single-chain variable fragment*

sdAbs – *Single-domain antibody* ou pequenos domínios

SDS-PAGE – *Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis*

SI – Sistema Imunológico

SIDA – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SIV – Vírus da Imunodeficiência Símia

SU – Glicoproteína de superfície

TAR – Terapia antirretroviral

TARc – Terapia antirretroviral combinada

Tat - *Transactivator protein*

TM – Glicoproteína transmembranar

VH – Domínio variável da cadeia pesada de um anticorpo

Vif - *Viral infectivity factor*

VIH – Vírus da Imunodeficiência Humana

VL – Domínio variável da cadeia leve de um anticorpo

Vpr - *Virus protein r*

Vpu - *Virus protein unique*

Vpx - *Virus protein x*

WHO - *World Health Organization*

6HB – *Six Helix Bundle*

1. Introdução

1.1. O Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH)

1.1.1. Origem e diversidade do VIH

A Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA) representa atualmente um dos principais problemas de saúde pública a nível mundial. Esta patologia resulta de um gradual comprometimento do Sistema Imunológico (SI), o que a longo prazo conduz ao desenvolvimento de infeções oportunistas, podendo ainda estar na origem de vários tipos de neoplasia [1]. O agente etiológico da SIDA é o Vírus da Imunodeficiência Humana (VIH) [2], um retrovírus pertencente ao género lentivírus e que provém de múltiplas transmissões zoonóticas do Vírus da Imunodeficiência Símia (SIV) [1]. Atualmente conhecem-se dois tipos de VIH (VIH-1 e VIH-2), os quais se encontram subdivididos em vários grupos, subtipos, sub-subtipos e diversas formas recombinantes (figura 1.1A) [3] [4]. O VIH-1 e VIH-2, compartilham semelhanças como mecanismos de replicação intracelular e modos de transmissão. Contudo, o VIH-2 é caracterizado por menor patogenicidade, viremia e transmissibilidade, carecendo ainda de um período de tempo superior até ao desenvolvimento de uma condição de imunodeficiência. Do ponto de vista epidemiológico, o VIH-2 é quase restrito a países da África Ocidental, sendo que o VIH-1 é o responsável pela pandemia a nível mundial [4].

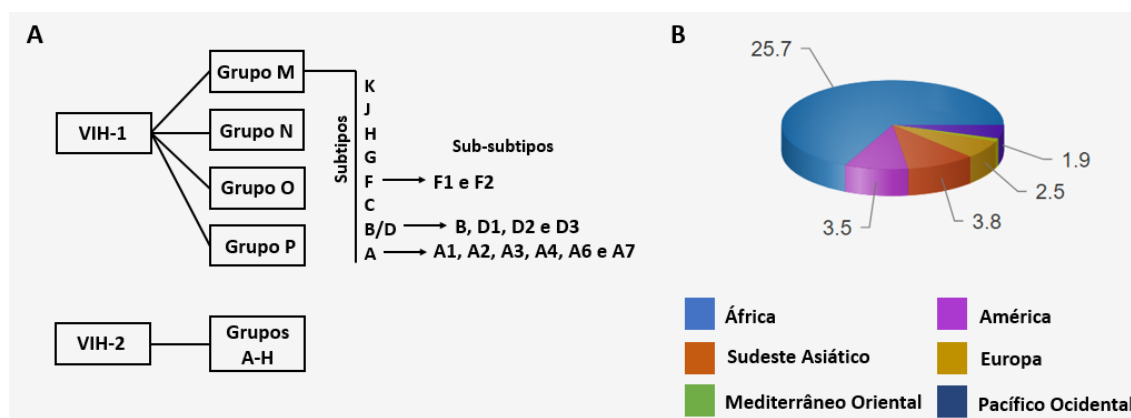


Figura 1.1 - A) Subdivisão dos vários grupos, subtipos e sub-subtipos de VIH-1 e VIH-2 (adaptado de [3]); B) Prevalência do VIH a nível mundial (em milhões) (adaptado de OMS, 2019).

O VIH é um dos maiores desafios que a humanidade alguma vez enfrentou. Desde a identificação, há aproximadamente sessenta anos, do primeiro caso de VIH em humanos [5], verifica-se que o VIH/SIDA ainda subsiste em larga escala [6]. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) relativos ao ano de 2018 indicaram a nível mundial 37,9 milhões de pessoas infetadas pelo vírus (figura 1.1B), 1,7 milhões de novas infeções e 770000 mortes devido ao VIH/SIDA (OMS,2019). Pesquisas intensivas durante décadas têm permitido o desenvolvimento de diversos fármacos capazes de controlar a progressão da infeção por VIH. Estes, aliados à implementação de programas de prevenção e tratamento, têm garantido uma diminuição gradual do número de óbitos associados ao VIH/SIDA em diversos países. Todavia, apesar dos progressos conseguidos, uma terapêutica eficaz na eliminação efetiva do vírus do organismo e uma vacina indutora de efeito protetor contra o mesmo carecem ainda de ser descobertas. A variabilidade genética caracterizadora do VIH (resultante de elevadas taxas de mutação e recombinação), acompanhada de um conjunto de mecanismos virais próprios, dificultam o desenvolvimento de semelhante terapêutica [4]. Perante este

cenário, é imperativo que se continue a estudar o VIH para que seja possível adquirir novos tratamentos, sobretudo de cariz profilático, cujo objetivo seja a erradicação do vírus e das comorbidades a ele associadas.

1.1.2. Estrutura e organização genómica

O VIH é um vírus envelopado e de morfologia esférica (100-120nm de diâmetro). Ancoradas ao envelope viral e projetadas à superfície do vírus surgem algumas proteínas do hospedeiro e aproximadamente 72 unidades da glicoproteína do envelope viral (ENV) [7]. Esta glicoproteína é um complexo gp120/gp41 envolvido na ligação e fusão do vírus com as células alvo (explorado em maior detalhe adiante) e, devido à sua disposição na superfície do vírus e imunogenicidade elevada, é o principal alvo da resposta imunológica aquando da infeção pelo VIH. Por essa razão, esta glicoproteína tem sido intensamente estudada, quer como alvo terapêutico, quer como um potencial imunogénio vacinal [8] [9].

O genoma do VIH é formado por duas moléculas de RNA idênticas, positivas e de cadeia simples (cerca de 9kb). Cada uma destas moléculas apresenta nove genes (figura 1.2) e é flanqueada por duas regiões *Long Terminal Repeats* (LTRs) cuja atividade regula a expressão do genoma viral [7] [10]. Três genes principais e comuns a todos os retrovírus, *gag* (*group-specific antigen*), *pol* (*polymerase*) e *env* (*envelope*) codificam as poliproteínas Pr55Gag, Pr160GagPol e Prgp160, respetivamente. Estas, ao serem processadas proteoliticamente, originam os vários constituintes, estruturais e enzimáticos, que compõem a partícula viral (figura 1.3) [7] [8]. Assim, da poliproteína Pr55Gag derivam componentes como matriz (MA), cápside estrutural (CA), cápside nuclear (NC) e p6 e, da poliproteína Prgp160, a gp120 ou glicoproteína de superfície (SU) e a gp41 ou glicoproteína transmembranar (TM). Por fim, a poliproteína Pr160GagPol determina a produção das enzimas virais (protease (PR), transcriptase reversa (RT) e integrase (IN)) (figura suplementar 6.1) [7] [10]. O genoma do VIH codifica ainda proteínas reguladoras como Tat (*transactivator protein*), e Rev (*RNA-splicing-regulator*), essenciais na regulação da transcrição dos genes virais e exportação do mRNA viral, respetivamente. Além destas, são ainda produzidas proteínas acessórias como Nef (*negative regulating factor*), Vif (*viral infectivity factor*), Vpr (*virus protein r*) Vpu (*virus protein unique*) e Vpx (*virus protein x*) [7] [11]. De um modo geral, as proteínas acessórias do vírus têm a capacidade de atuar no ambiente intracelular de forma a modificá-lo e a garantir uma replicação viral eficiente. Nef ao regular negativamente a expressão de CD4 e de moléculas do complexo major de histocompatibilidade (MHC) de classe I, previne a superinfeção e garante a proteção de células infetadas da ação de células T citotóxicas [12]. Vpu, ao destruir moléculas CD4 recém-sintetizadas no retículo endoplasmático, evita interações inespecíficas CD4-ENV neste organelo que eventualmente originem a retenção da glicoproteína do envelope viral [13]. Vpr intervém no transporte do genoma viral do citoplasma para o núcleo [14]. Vif interage com fatores de restrição celulares como as proteínas APOBEC3G, impedindo que estas consigam suprimir a replicação viral [15]. E, finalmente Vpx, que ao inibir o fator de restrição SAMHD1, facilita a transcrição reversa em células mieloides como macrófagos e células dendríticas [16].

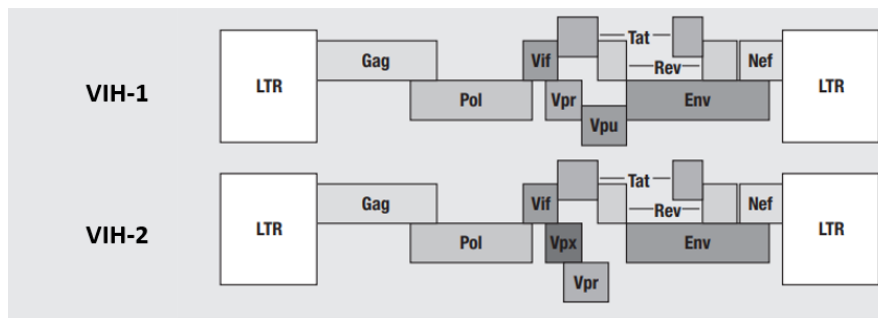


Figura 1.2 – Estrutura e organização do genoma do VIH-1 e VIH-2 (adaptado de [10]).

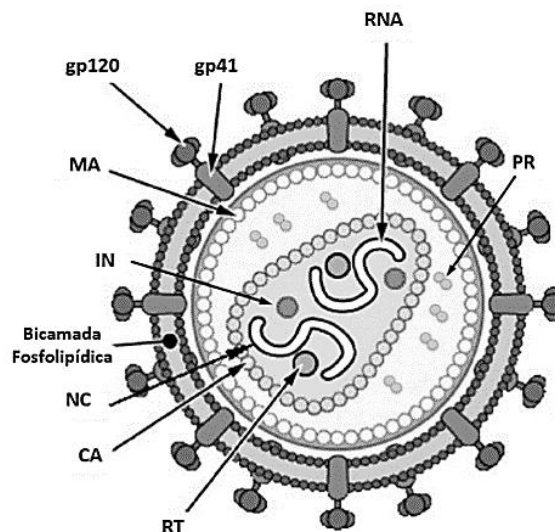


Figura 1.3 – Representação esquemática do virião VIH-1. MA – Matriz, CA – Cápside estrutural, NC – Cápside nuclear, PR – Protease, RT – Transcriptase reversa, IN – Integrase. (adaptado de [8]).

1.1.3. Ciclo de replicação e principais células alvo

O VIH tem como alvo células da linhagem hematopoiética/linfoide, principalmente células T auxiliares e macrófagos e, em menor extensão, células dendríticas e microgliais. Estas células têm em comum o facto de expressarem CD4, uma proteína envolvida no reconhecimento imunológico, e um dos co-receptores de quimiocinas (CCR5 ou CXCR4) [8] [17]. A entrada do vírus na célula alvo é mediada pela glicoproteína gp120, que inicialmente se liga ao recetor CD4 [18] e, após algumas alterações conformacionais, a um dos co-receptores celulares, dependendo do tropismo viral [19]. Por consequência, o arranjo tridimensional da glicoproteína gp41 é igualmente alterado (figura suplementar 6.2), resultando na fusão do vírus com a célula alvo [20] [21] [22]. Já no interior desta célula, o genoma viral é finalmente exposto. Assim, por ação da transcriptase reversa do vírus, a qual é altamente propensa a erros, o RNA viral é convertido na sua cadeia de DNA complementar. Este DNA recém-sintetizado, em associação com outras proteínas virais (complexo de pré-integração - PIC) é importado até ao núcleo, onde a integrase viral promove a sua inserção no genoma celular (provírus) [23]. Neste momento, a célula diz-se infetada de forma permanente, podendo o vírus permanecer latente em células não estimuladas (designados de reservatórios virais). Aquando da ativação das células infetadas e da transcrição e tradução do provírus integrado, são sintetizadas as poliproteínas necessárias à formação de novos viriões. Os precursores Pr55Gag e Pr160GagPol e, mais tarde, as glicoproteínas do envelope viral, associam-se à superfície interna da membrana plasmática. À medida

que a partícula viral é libertada da superfície celular, o virião sofre uma alteração morfológica conhecida como maturação, na qual ocorre o processamento proteolítico das poliproteínas Pr55Gag e Pr160GagPol pela protease viral. Após este processo, o virião diz-se então pronto para infectar uma nova célula e iniciar um novo ciclo de infecção [11]. Devido à incorporação de moléculas citoplasmáticas e de superfície da célula hospedeira, os viriões apresentam características das células onde foram produzidos que se traduzem em maior infecciosidade e capacidade de evasão ao SI [24]. Um esquema ilustrativo do ciclo de replicação do VIH encontra-se representado na figura 1.4 [25].

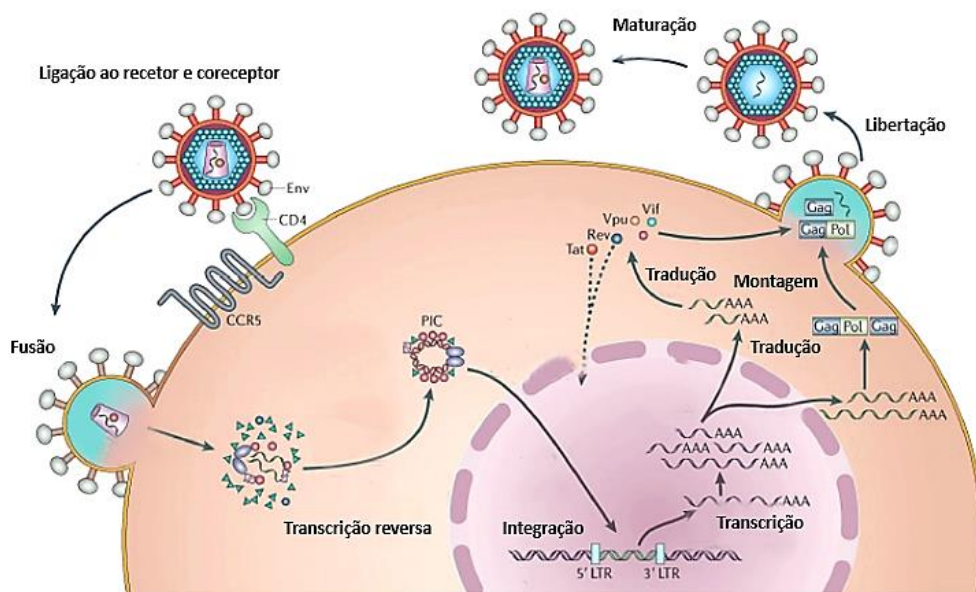


Figura 1.4 – Representação esquemática do ciclo de replicação do VIH (adaptado de [25]).

1.1.4. Terapêuticas atuais e emergentes

O estudo das diferentes etapas que compõem o ciclo de replicação viral permitiu identificar possíveis alvos terapêuticos. Assim, foram desenvolvidas várias moléculas, com diferentes espectros de atividade, e com a capacidade de interromper ou retardar o processo replicativo do vírus (tabela 1.1) [26] [27]. A estratégia terapêutica atual, a terapia antirretroviral combinada (TARc), garante a supressão viral e consequente restauro da função imunológica, evitando assim a progressão e transmissão da infecção por VIH [28]. A TARc consiste geralmente em dois nucleósidos inibidores da transcriptase reversa (NRTIs) combinados com um não-nucleósido inibidor da transcriptase reversa (NNRTI) ou um inibidor da protease (PI). No entanto, moléculas de outras classes, por possuírem um mecanismo de ação distinto e diferentes perfis de resistência e segurança, podem constituir uma alternativa caso se verifique a ineficácia do tratamento de primeira linha. A diversidade de fármacos atualmente disponíveis possibilita ainda a adoção de um regime terapêutico personalizado para cada indivíduo em particular [29].

Apesar do sucesso dos regimes antirretrovirais atuais, a TARc apresenta algumas limitações. Entre os principais inconvenientes encontra-se a adesão à terapêutica, dado o carácter vitalício dessa mesma adesão. Esta necessidade deve-se ao facto da TARc suprimir a infecção apenas em células com replicação viral ativa e não ter qualquer efeito sobre os reservatórios virais. A existência destes reservatórios é o principal entrave à eliminação completa do vírus do organismo e ao estabelecimento

de um tratamento definitivo para a infecção. Assim, nos últimos anos, a pesquisa científica tem-se centrado na identificação e caracterização destes reservatórios, numa tentativa de desenvolver metodologias capazes de os neutralizar [30]. A indução da expressão do provírus integrado com consequente morte das células infetadas ou a inibição da sua expressão através do bloqueio da Tat, o ativador da transcrição do genoma viral, estão entre algumas das estratégias apontadas [31] [32]. A elevada toxicidade e o aparecimento a longo prazo de formas virais resistentes são outras das limitações. Estas, ao serem menos suscetíveis aos fármacos utilizados, comprometem seriamente a eficácia da terapêutica. Por essa razão, é necessário encontrar novos alvos para intervenção bem como terapêuticas alternativas que procurem bloquear outros estágios do ciclo de replicação viral e conseguir combater as formas virais mais resistentes que já se encontram em circulação [33]. O processo de entrada do vírus na célula alvo tem-se revelado particularmente promissor para o desenvolvimento de novas moléculas terapêuticas. Estas moléculas, denominadas inibidores de entrada, podem ter um papel determinante pois surgem como um complemento às estratégias já existentes [34]. O desenvolvimento de um inibidor de entrada de caráter biológico é o foco principal deste trabalho.

Tabela 1.1 - Cinco classes principais de fármacos em uso corrente (adaptado de [27]).

Classe	Ponto de ação no ciclo de replicação do Vírus	Exemplos de fármacos
Nucleósidos inibidores da transcriptase reversa (NRTI)	Inibe a atividade da transcriptase reversa, impedindo a conversão do RNA em dsDNA	<i>Zidovudina</i> <i>Didanosina</i> <i>Abacavir</i> <i>Tenofovir</i>
Não-nucleósidos inibidores da transcriptase reversa (NNRTI)	Inibe a atividade da transcriptase reversa, impedindo a conversão do RNA em dsDNA	<i>Nevirapina</i> <i>Delavirdina</i> <i>Efavirenz</i>
Inibidores da Protease (PI)	Inibe o processo de maturação das novas partículas virais	<i>Ritonavir</i> <i>Fosamprenavir</i> <i>Tipranavir</i> <i>Darunavir</i>
Inibidores da Integrase	Bloqueia a integrase viral impedindo a integração do genoma viral na célula hospedeira	<i>Raltegravir</i> <i>Dolutegravir</i>
Inibidores de entrada	Interfere com a glicoproteína gp41, impedindo a formação do 6HB e, consequentemente, o processo de fusão entre o vírus e a célula alvo	<i>Enfuvirtide</i>
	Interfere com a ligação do vírus ao recetores de quimiocinas CCR5	<i>Maraviroc</i>

1.1.5. Os inibidores de entrada

Como exposto no ponto anterior, grande parte das estratégias atuais têm como alvo as enzimas virais e a inibição do processo de replicação viral. No entanto, apresentam a desvantagem de atuar numa fase em que o vírus já se encontra no interior da célula hospedeira. Os inibidores de entrada, ao restringirem à priori o acesso do vírus ao interior da célula, impedem não só que a infeção se estabeleça como constituem opções menos tóxicas e com menor probabilidade de desenvolvimento de resistência cruzada com os restantes agentes. Além disso, como estas moléculas representam uma

barreira aos eventos iniciais que promovem a infecção, além de possuírem ação terapêutica podem ser igualmente úteis como agentes profiláticos [34] [35].

Cada estágio do mecanismo de entrada é um potencial alvo para intervenção. Desta forma, os inibidores de entrada subdividem-se em inibidores da ligação gp120-CD4, inibidores da ligação gp120-co-receptores e inibidores de fusão [36]. Os inibidores gp120-CD4 têm ação sobre a ligação entre a gp120 e o recetor celular CD4, bloqueando a primeira etapa do processo de entrada. Com vista a inibir este estágio do ciclo de replicação viral já foram exploradas diversas moléculas entre as quais PRO-542, BMS-626529, e Ibalizumab. O PRO-542 é uma proteína de fusão semelhante a um anticorpo no qual as regiões variáveis foram substituídas pelos domínios D1 e D2 do CD4 humano. Assim, por interação direta com a gp120, previne a ligação do vírus a células saudáveis [37]. Vários estudos comprovaram que a sua utilização assegura uma redução significativa da carga viral [38] [39]. Todavia, atualmente não existe em curso nenhum ensaio com PRO-542 (U. S. *National Library of Medicine*, 2019). BMS-626529 (*Fostemsavir*) é uma molécula capaz de interagir com a gp120, impossibilitando que esta adquira a conformação que lhe garante a ligação a CD4. BMS-626529 encontra-se atualmente em estudos clínicos de fase III e espera-se que seja aprovado num futuro próximo [40] [41]. O Ibalizumab comercializado como *Trogarzo*, foi aprovado em março de 2018 (U.S. *Food and Drug Administration* (FDA), 2018) para o tratamento da infecção por VIH e consiste num anticorpo monoclonal humanizado que bloqueia a entrada do vírus através da ligação ao recetor CD4 [42]. A respeito dos inibidores da ligação gp120-co-receptores, estes atuam ao nível dos co-receptores celulares CCR5 e CXCR4, impedindo a ligação entre estes e a gp120. Foram estudadas várias moléculas entre as quais *Aplaviroc*, *Vicriviroc* e *Maraviroc* cujo mecanismo de ação se baseia na indução de alterações na estrutura tridimensional do co-receptor CCR5 as quais impedem a ligação à gp120, funcionando, portanto, como inibidores alostéricos [43]. Entre as moléculas anteriormente descritas, apenas o *Maraviroc* foi aprovado para uso clínico (FDA, 2007). Um anticorpo monoclonal anti-CCR5, PRO140, encontra-se em ensaios clínicos de fase IIb/III [44]. AMD3100 e AMD11070 foram algumas das moléculas estudadas com o objetivo de bloquear a ligação gp120-CXCR4. No entanto, nenhuma delas obteve aprovação [45] [46]. Por último, os inibidores de fusão são moléculas que de um modo geral têm como alvo a glicoproteína gp41, em particular os diferentes estágios conformacionais por ela adquiridos aquando do processo de entrada. Ao ligar-se à gp41 impedem as alterações conformacionais necessárias ao processo de fusão [47]. Até ao momento, o único inibidor de fusão aprovado pela FDA é o *Enfuvirtide* ou T-20, um péptido sintético cuja sequência mimetiza parte da região CHR da gp41. Acredita-se que o *Enfuvirtide* bloqueia o processo de fusão por competição com a CHR viral, impedindo a sua interação com a região NHR e formação do 6HB [48]. A Sifuvirtida é um péptido cujo mecanismo de ação é análogo ao *Enfuvirtide*. Esta molécula apresenta um maior tempo de semi-vida no plasma, tendo ainda demonstrada atividade contra formas virais resistentes ao *Enfuvirtide* [49] [50]. A inibição do processo de fusão através do bloqueio da inserção do péptido de fusão na célula hospedeira é outra estratégia em análise. Este é o mecanismo de ação do péptido VIRIP e dos seus derivados, no entanto, a utilização destes fármacos ou outros que se baseiem no mesmo mecanismo de ação, permanece ainda por aprovar [51].

Em suma, embora vários inibidores de entrada já tenham sido desenvolvidos, apenas três foram aprovados pela FDA (*Enfuvirtide*, *Maraviroc* e *Trogarzo*). As diferentes moléculas aprovadas visam a gp41, co-receptor CCR5 e o recetor celular CD4, respetivamente. A descoberta e desenvolvimento de novos agentes direcionados a outros alvos do processo de entrada, nomeadamente a gp120 devido ao seu papel central neste processo, surge hoje como uma necessidade imperativa [52].

1.2. A Glicoproteína Gp120

1.2.1. Organização estrutural da gp120

A glicoproteína gp120 é extremamente complexa e portadora de uma enorme variabilidade. As poucas regiões conservadas de que dispõe restringem-se essencialmente aos locais de interação com o recetor e co-receptores celulares. Estes locais, pelo facto de apresentarem um maior grau de conservação, constituem os alvos preferenciais do sistema imunológico bem como de eventuais fármacos [53] [54]. Por essa razão, o vírus e, em particular a gp120, desenvolveu um conjunto de mecanismos que dificultam o acesso e reconhecimento destas regiões. O elevado grau de variabilidade global, a rápida emergência de variantes virais resistentes (facilitada pela replicação de baixa fidelidade do vírus), a glicosilação extensa que limita o acesso a regiões conservadas e apresenta o vírus como próprio e a plasticidade conformacional são alguns desses mecanismos [55]. Na sua estrutura nativa, a gp120 pode ser dividida em cinco domínios proteicos variáveis (V1- V5) expostos à superfície e fortemente glicosilados e cinco domínios conservados (C1-C5) localizados numa região mais interna, desprovidos de glicanos e envolvidos em interações com o recetor celular, co-receptores e gp41 [56] [57]. Aquando da ligação ao recetor CD4, o arranjo tridimensional da gp120 é alterado, dando origem à formação de um terceiro domínio, denominado folha de ponte [58] [59] [60]. Este consiste em dois pares de folhas antiparalelas que ligam os domínios interno e externo e, em conjunto com a região V3 (determinante no tropismo viral), desempenha um papel importante na ligação aos co-receptores celulares [60]. Próximo da interseção entre os três domínios foi mapeado o local interveniente na ligação ao recetor celular CD4. No centro desta interface existe uma cavidade hidrofóbica, a cavidade *Phe43*, que se sabe estar particularmente envolvida na ligação gp120-CD4 [8] [61]. A figura 1.5 apresenta a estrutura tridimensional desta glicoproteína aquando da ligação a CD4 [60].

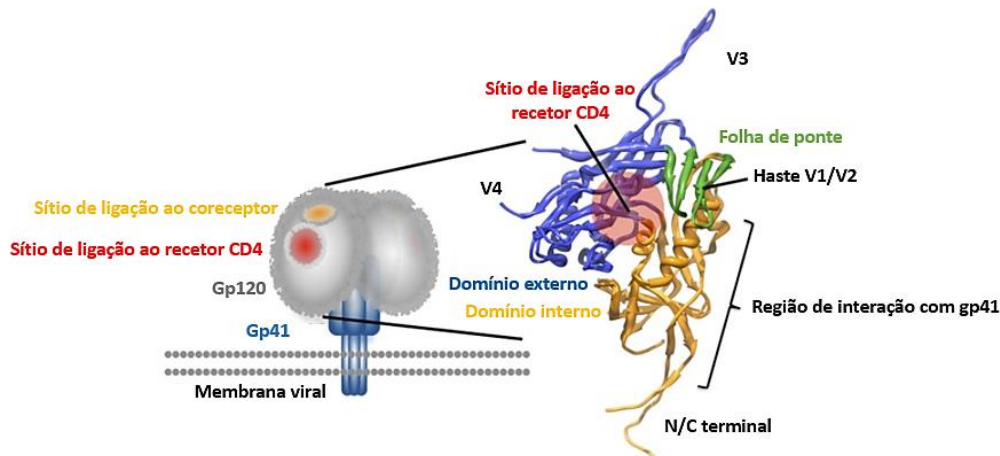


Figura 1.5 – Estrutura tridimensional da glicoproteína gp120 aquando da ligação a CD4 (adaptado de [60]).

1.2.2. A gp120 como alvo terapêutico

O aumento do conhecimento funcional e estrutural da gp120 permitiu identificar diferentes locais de vulnerabilidade nesta glicoproteína. O sítio de ligação ao recetor celular CD4 (CD4bs) é mencionado como sendo um desses locais. Já foram encontradas diversas moléculas capazes de interagir com esta região da gp120 entre as quais anticorpos extremamente potentes como VRC01, HJ16 e b12 [62] [63] [59]. Ainda dentro dos inibidores de CD4bs foram identificadas algumas moléculas sintéticas capazes de interagir com resíduos na cavidade *Phe43* como M48U1 e NBD/DMJ [64] [65]. Outra das regiões suscetíveis desta glicoproteína é o sítio de ligação aos co-receptores

celulares (CD4i). A enorme proximidade entre a membrana viral e celular restringe o acesso a este local, pelo que apenas moléculas de dimensões reduzidas, como fragmentos de anticorpos tais como m36 e 17b, conseguem atingir eficazmente esta região [55] [66]. Por último, o escudo de glicanos da gp120, que embora proteja o acesso a regiões conservadas, constitui também uma região potencialmente vulnerável que é reconhecida por alguns anticorpos, designadamente 2G12, PGT122, PG9 e PG16 [62] [67] [68].

A utilização de anticorpos, em particular anticorpos amplamente neutralizantes (bNAbs) tem vindo a ser explorada do ponto de vista terapêutico e profilático. Ensaio pré-clínicos em animais demonstraram as potencialidades terapêuticas e protetoras dos bNAbs [69]. É de mencionar ainda que estas moléculas, em conjunto com agentes de reversão de latência como os inibidores de histona desacetilase (HDAC), diminuem a repercussão dos reservatórios virais após interrupção da terapêutica em ratinhos humanizados [70]. Os bNAbs revelam ainda efeito antiviral em indivíduos infetados pelo VIH [71]. Procura-se, porém, determinar se estes anticorpos poderão proteger indivíduos não infetados da aquisição do vírus [72]. No que diz respeito a este aspeto, estão atualmente a ser desenvolvidos estudos de prevenção mediada por anticorpos como HVTN 703/HPTN 081 e HVTN 704/HPTN 085 cujo objetivo é avaliar esta questão (*Antibody Mediated Prevention* (AMP), 2019). Em conjunto, estes resultados apresentam os anticorpos como ferramentas eficazes na luta contra o VIH, uma vez que estas moléculas têm auxiliado não só na caracterização de vários epítomos virais essenciais, que poderão ser particularmente úteis na projeção de um imunogénio vacinal adequado, mas também se apresentam por si só como um agente terapêutico altamente potente [73]. Além de todas estas vantagens, a utilização de anticorpos tem constituído ainda uma mais-valia na administração direcionada de fármacos. Estas moléculas, quando conjugadas a fármacos, alteram a absorção, distribuição e eliminação destes do organismo, conferindo benefícios como maior eficácia e segurança. Assim, o recurso a anticorpos pode garantir o direcionamento específico dos fármacos para células já infetadas ou que possam constituir um potencial alvo do vírus [74].

1.3. Anticorpos

1.3.1. Características e propriedades dos anticorpos

O sistema imunológico é composto por um conjunto de barreiras, células e moléculas efetoras. Estas, cooperam como um todo integrado de modo a garantir a proteção do organismo. Os anticorpos (ou imunoglobulinas) constituem uma parte crítica de extrema relevância deste sistema, na medida em que reconhecem potenciais agentes invasivos e ativam mecanismos efetores com vista à sua destruição [75]. Do ponto de vista estrutural, um anticorpo convencional é constituído por duas cadeias polipeptídicas pesadas (H) e duas cadeias polipeptídicas leves (L), ligadas covalentemente através de pontes dissulfureto, dando origem a uma estrutura semelhante a um “Y”. As cadeias leves podem ser de dois tipos, lambda (λ) ou kappa (κ). As cadeias pesadas surgem em cinco formas diferentes, definem a classe do anticorpo (M (IgM), D (IgD), G (IgG), A (IgA) ou E (IgE)) e, por conseguinte, a sua função efetora. Cada uma destas cadeias é constituída por domínios constantes (CH e CL) e variáveis (VH e VL), como representado na figura 1.6 [76]. Posicionada na região inferior e formada unicamente por domínios constantes, a região Fc está envolvida na ativação da resposta imune e contribui para o tempo de semi-vida elevado destas moléculas no plasma sanguíneo. Já a região de ligação ao antígeno ou *fragment antigen binding* (Fab), é constituída por domínios constantes e variáveis, estes últimos compostos por três sub-regiões hipervariáveis denominadas *Complementarity Determining Regions* (CDR) interligadas entre si por quatro sub-regiões conservadas denominadas *frameworks* (FR) [75]. As CDR fazem contacto direto com o antígeno e apresentam composições e tamanho únicos para cada anticorpo. A elevada diversidade destas regiões é conseguida através de

recombinação e hipermutação somática, fenómenos essenciais para o reconhecimento e neutralização da grande diversidade de antígenos existente [77] [78].

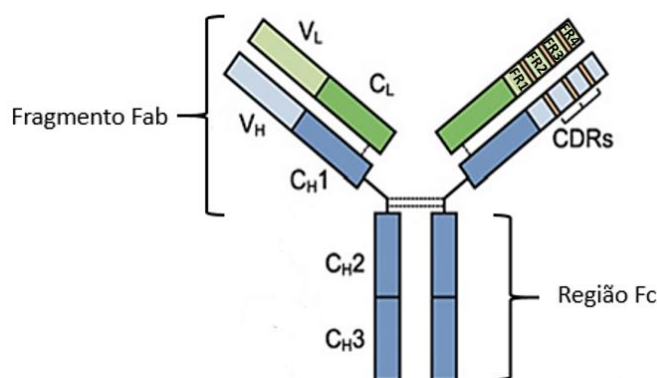


Figura 1.6 – Representação esquemática da estrutura de um anticorpo (IgG) (adaptado de [76]).

Os anticorpos constituem ferramentas essenciais em pesquisa, diagnóstico e terapia. Nas últimas duas décadas tornaram-se uma parte fundamental dos regimes de tratamento de diversas condições, incluindo oncologia, doenças inflamatórias crônicas, doenças infecciosas, cardiovasculares, entre outras [79]. Em comparação com outras moléculas disponíveis, os anticorpos apresentam vantagens substanciais como elevada especificidade, reduzida toxicidade e período de semi-vida relativamente longo [80]. Contudo, a natureza complexa de um anticorpo no seu formato convencional por vezes não é compatível com a sua eficácia, o que muitas vezes constitui um obstáculo importante ao desenvolvimento imediato de um composto terapêutico. A baixa penetração nos tecidos, especialmente em tumores sólidos, e a fraca ligação a epítomos ocluídos e que só podem ser acedidos por moléculas com tamanho inferior, estão entre as principais desvantagens apontadas [81]. Avanços em métodos enzimáticos, clonagem molecular e engenharia de anticorpos permitiram a manipulação destas moléculas, promovendo o desenvolvimento de anticorpos recombinantes e fragmentos de anticorpos [82].

1.3.2. Fragmentos de anticorpos

De modo a otimizar as propriedades farmacológicas dos anticorpos, procedeu-se à utilização de domínios moleculares específicos em detrimento do anticorpo na sua estrutura completa. De um modo geral têm vindo a utilizar-se três tipos de fragmentos de anticorpos: *fragment antigen binding* (Fab), *single-chain variable fragment* (scFv) e *single-domain antibody* ou pequenos domínios (V_H ou V_L) (sdAbs) (figura 1.7) [83] [84]. Comparativamente ao anticorpo na sua estrutura convencional (IgG), os fragmentos de anticorpos apresentam vantagens evidentes, como por exemplo a sua facilidade de produção, geralmente através do uso de sistemas de expressão microbianos, o que se traduz num processo rápido, de elevado rendimento e custo reduzido [85]. Por outro lado, a reduzida dimensão destas moléculas garante-lhes uma maior penetração tecidular e capacidade de acesso e reconhecimento de epítomos menos acessíveis (particularmente útil no caso do VIH devido aos mecanismos virais que restringem o acesso a estas regiões). Por último, pelo facto de serem desprovidos do domínio Fc, os fragmentos de anticorpos são menos imunogénicos e apresentam um tempo de semi-vida em circulação inferior ao de um anticorpo convencional [86]. Esta *clearance* superior pode constituir uma vantagem nomeadamente aquando da utilização de anticorpos marcados radioactivamente. Contudo, por norma, para que estas moléculas exerçam a sua ação terapêutica, são

necessários tempos de semi-vida superiores, os quais podem ser conseguidos pela sua conjugação com proteínas como a albumina ou com componentes como o polietilenoglicol (PEG) [87] [88] [89].

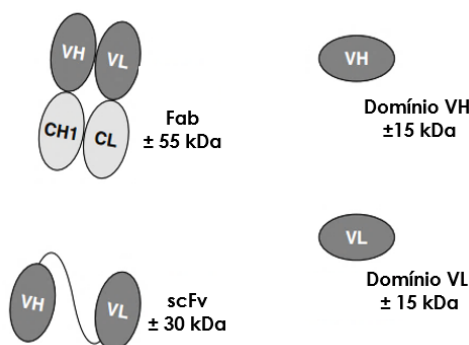


Figura 1.7 – Diferentes fragmentos de anticorpos (adaptado de [84]).

1.4. Produção e seleção de anticorpos recombinantes

1.4.1. Tecnologia de hibridoma

A tecnologia de hibridoma foi apresentada por Kohler e Milstein no final dos anos setenta e é uma das estratégias para a obtenção de anticorpos monoclonais. Esta tecnologia envolve a imunização de um animal com um antígeno específico e subsequente remoção do seu baço e isolamento de linfócitos B. Em seguida, os linfócitos B isolados são fundidos *in vitro* com uma linha celular de mieloma. Os produtos de fusão resultantes (hibridomas) são então colocados em cultura em meio seletivo HAT (hipoxantina, aminopterina, timidina) o qual irá promover unicamente a sobrevivência e proliferação dos hibridomas. Os hibridomas produtores dos anticorpos de interesse são posteriormente selecionados e subcultivados [90]. Apesar de constituir um método bem estabelecido, os anticorpos obtidos por meio desta tecnologia têm essencialmente origem murina. Por essa razão, aquando da administração humana destas moléculas, ocorrem reações imunológicas adversas que limitam a sua aplicação clínica [91]. Em segundo lugar, esta tecnologia constitui um processo demorado e os anticorpos obtidos nem sempre apresentam elevada afinidade e especificidade para o antígeno em estudo. Além disso, certos agentes que são imunogénicos em humanos, podem não o ser no modelo murino, o que impossibilita a obtenção de certos grupos de anticorpos [92].

Mais recentemente, a humanização dos anticorpos surgiu como uma alternativa para a produção de moléculas com menor imunogenicidade e em que pudesse ser mantida a afinidade e especificidade de origem. Simultaneamente foram também desenvolvidas tecnologias como o *Phage Display*, uma abordagem que permite a rápida seleção dos melhores anticorpos para o propósito pretendido entre uma *pool* de anticorpos em estudo [93].

1.4.2. Tecnologia de *Phage Display*

A tecnologia de *Phage Display* foi desenvolvida como uma alternativa à tecnologia tradicional de hibridoma e foi descrita pela primeira vez em 1985 [94]. Esta tecnologia recebeu o Prémio Nobel da Química em 2018 por George Smith e Sir Gregory Winter, é uma estratégia robusta e versátil e, atualmente, é o método de seleção de anticorpos mais amplamente utilizado [93] [95]. O *Phage Display*, aliado à tecnologia de DNA recombinante, permitiu revolucionar o processo inerente à obtenção de anticorpos monoclonais. Em conjunto, estas duas metodologias garantem a manipulação, seleção e expressão de anticorpos em quantidades praticamente ilimitadas [96].

1.4.2.1. Bibliotecas de anticorpos

O primeiro passo desta metodologia envolve a construção de uma biblioteca de anticorpos. Uma biblioteca de anticorpos pode ser do tipo Fab, scFv ou sdAb e caracteriza-se por um conjunto de segmentos gênicos que codificam para as regiões variáveis da cadeia leve e/ou pesada dos anticorpos convencionais. Este conjunto de segmentos é obtido a partir do isolamento do mRNA de células B, preferencialmente de tecidos como o baço ou medula óssea, seguido da sua transcrição reversa, amplificação por PCR (*Polymerase Chain Reaction*) e clonagem num vetor apropriado para aplicação em *Phage Display* [97].

As bibliotecas de anticorpos podem ser categorizadas em bibliotecas imunes, naive ou sintéticas. Uma biblioteca imune é composta por uma *pool* de genes de anticorpos que derivam do isolamento de mRNA de células B humanas ou animais que estiveram à priori obrigatoriamente expostas a um antígeno em específico, quer por imunização prévia ou infecção natural. Este tipo de biblioteca tem a grande vantagem de gerar anticorpos que sofreram maturação por afinidade pelo sistema imune e que por essa razão são altamente específicos para o antígeno [98]. Uma biblioteca *naive* é composta por uma *pool* de genes de anticorpos que derivam do isolamento de mRNA de células B humanas ou animais sem exposição intencional a um antígeno específico. Estas bibliotecas são consideradas universais pois não apresentam especificidade para nenhum alvo em particular, permitindo a seleção de anticorpos para uma grande diversidade de antígenos. Todavia, a seleção bem-sucedida de anticorpos de elevada afinidade pressupõe que estas bibliotecas devam ser extraordinariamente diversas [99]. Por último, numa biblioteca sintética, os genes que codificam para os anticorpos são obtidos *in vitro* através de métodos como mutagênese dirigida ou técnicas baseadas em PCR. Este tipo de biblioteca é particularmente útil quando a imunização não é possível [100].

Independentemente do objetivo, um parâmetro chave para uma biblioteca de anticorpos promissora é a sua complexidade/diversidade, ou seja, o número de elementos distintos que a constituem. Isto acontece porque quanto maior a diversidade de uma dada biblioteca, maior a probabilidade de encontrar um anticorpo de elevada afinidade para um determinado antígeno. Até recentemente, a avaliação quantitativa da complexidade e qualidade de uma biblioteca de anticorpos era inadequadamente abordada devido à elevada similaridade e comprimento das sequências que a constituem. A complexidade era geralmente inferida pela eficiência de transformação acompanhada da sequenciação de alguns elementos aleatórios da biblioteca. Porém, inferir a diversidade segundo este método fornecia informações limitadas sobre a diversidade real. O aparecimento de tecnologias como *Next Generation Sequencing* (NGS) trouxe uma ferramenta fundamental para avaliar a diversidade de uma biblioteca de anticorpos [101].

1.4.2.2. Seleção de anticorpos por *Phage Display*

A tecnologia de *Phage Display* baseia-se na clonagem de DNA exógeno de modo a permitir a expressão de proteínas, incluindo péptidos ou fragmentos de anticorpos funcionais na superfície de um bacteriófago filamentosos (fago) [94]. Inicialmente, uma biblioteca de sequências de DNA é clonada num vetor fagemídeo, como por exemplo pComb3X-SS (figura suplementar 6.3), em fusão com um gene que codifica para uma proteína de revestimento do fago (idealmente a pIII) [102]. Células de *Escherichia coli* (*E. coli*) transformadas com os fagemídeos e, posteriormente infetadas por bacteriófagos auxiliares, garantem a produção de um elevado número de fagos, cada um deles capaz de exibir à superfície um único anticorpo entre os vários que constituem a biblioteca [102] [103]. Os fagos produzidos e, por conseguinte, os anticorpos, são então submetidos a um processo cíclico (*panning*), onde serão selecionados tendo por base a afinidade e especificidade para o antígeno de interesse (figura 1.8) [102] [103]. Fagos com anticorpos de especificidade e afinidade reduzidas, não ligados ou fracamente ligados ao antígeno, são eliminados num processo de lavagem. Por outro lado,

fagos capazes de se ligar fortemente ao antígeno, são eluídos, recuperados e utilizados para infectar *E. coli* para reamplificação das partículas fágicas. Este processo de ligação, lavagem e eluição é repetido cerca de três a cinco vezes, até à seleção de anticorpos de elevada afinidade e especificidade [103]. Por fim, são determinadas as sequências de DNA intrínsecas à produção dos anticorpos de interesse, de forma a que estes possam ser produzidos e analisados funcionalmente [102] [104].

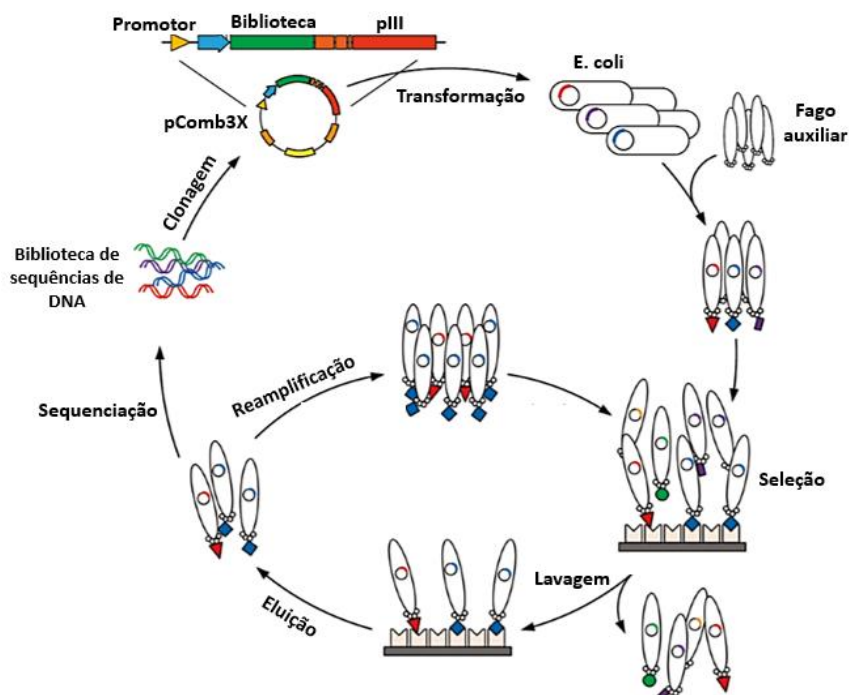


Figura 1.8 – Representação esquemática do processo inerente à tecnologia de *Phage Display* (adaptado de [102]).

A tecnologia de *Phage Display* tem sido amplamente utilizada no campo do VIH, permitindo mapear epítomos virais capazes de induzir anticorpos neutralizantes. A caracterização dos anticorpos e dos epítomos virais por eles reconhecidos poderá proporcionar o desenvolvimento de imunogénios adequados (formulações de vacinas), ou até mesmo, novos fármacos capazes de bloquear o início ou a progressão da infeção [105] [106].

1.5. Objetivo

O presente trabalho foi desenvolvido no laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-UL). O grupo de investigação onde o trabalho foi realizado foca-se no desenvolvimento de anticorpos recombinantes terapêuticos com aplicabilidade em áreas como oncologia, doenças infecciosas e doenças neurodegenerativas.

Este trabalho encontra-se integrado no projeto PGG/015/2016, suportado pelo programa Gilead Génese “Desenvolvimento de anticorpos biespecíficos anti-gp120/gp41 para o tratamento da infeção do VIH-1”, cujo objetivo final é a obtenção de um anticorpo recombinante com uma ação de neutralização dupla no processo de entrada viral. O grupo em questão e em colaboração com o grupo do Professor João Gonçalves da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa já desenvolveu anticorpos anti-gp41 e, neste momento, concentra-se no desenvolvimento de anticorpos anti-gp120 [107]. Posto isto, o objetivo desta dissertação de mestrado consistiu no desenvolvimento de anticorpos de coelho específicos para a glicoproteína gp120, nomeadamente para o epítipo responsável pela interação com o recetor CD4 expresso pelas células alvo. Para isso, quatro coelhos foram previamente

imunizados com *Vaccinia vírus prime-gp120* durante seis meses [108]. Em seguida, extraiu-se o baço e medula óssea do coelho imunizado que apresentou a resposta imunitária mais promissora contra a gp120, isolou-se o seu mRNA e, com base neste, sintetizou-se cDNA. Este cDNA foi usado na construção de bibliotecas imunizadas de anticorpos de coelho (VH e VL) pela amplificação das diferentes famílias de cada um destes domínios. O cDNA das bibliotecas VH e VL foi posteriormente utilizado para a construção de uma biblioteca imunizada scFv. Esta biblioteca foi clonada no fagemídeo pComb3X-SS. Paralelamente, e fazendo uso das bibliotecas VH e VL já construídas anteriormente, procedeu-se à seleção de anticorpos específicos para a glicoproteína gp120 por meio da tecnologia de *Phage Display*. Futuramente, os anticorpos identificados serão clonados com os anticorpos anti-gp41 já selecionados de modo a desenvolver anticorpos biespecíficos contra o VIH-1 [107]. A metodologia usada para o desenvolvimento de anticorpos anti-gp120 encontra-se esquematizada na figura 1.9.

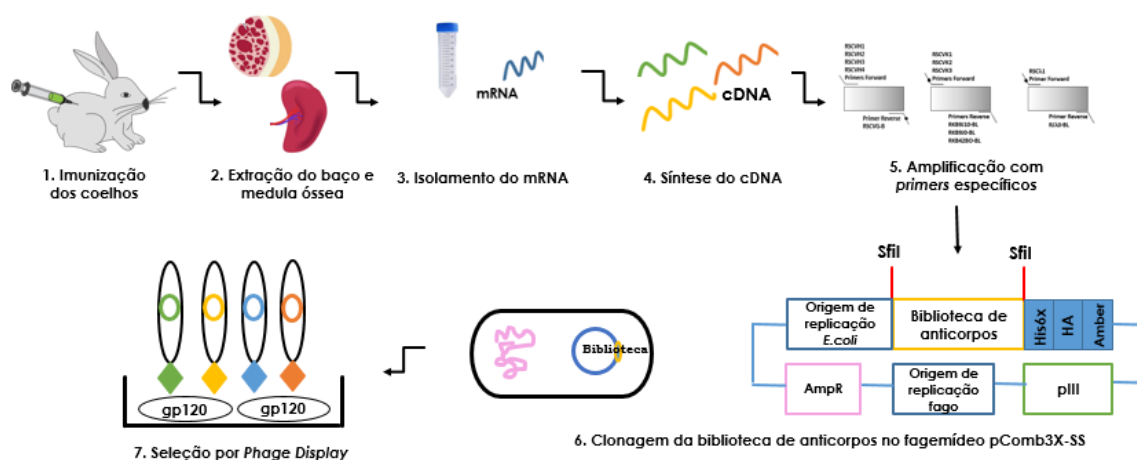


Figura 1.9 – Metodologia seguida no presente trabalho para o desenvolvimento de anticorpos recombinantes.

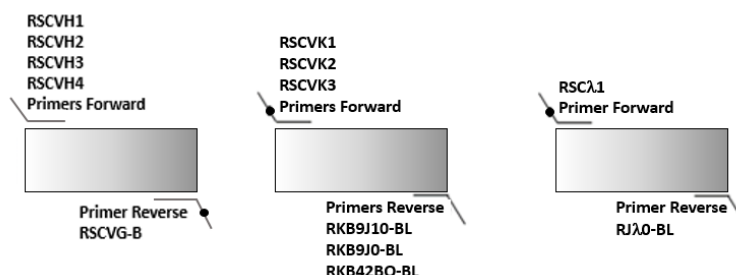
2. Materiais e Métodos

2.1. Construção da biblioteca de anticorpos (scFv)

2.1.1. Amplificação por PCR dos genes que codificam para os domínios VH e VL dos anticorpos (1ª ronda de PCR)

Para amplificar as sequências que codificam para os domínios de interesse recorreu-se às bibliotecas imunizadas de anticorpos de coelho (VH e VL) já anteriormente construídas. Após isolamento do DNA plasmídico com recurso ao QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen), procedeu-se às amplificações pretendidas através da reação em cadeia da polimerase (PCR). A PCR foi realizada no termociclador (VWR Collection Thermal Cycler DOPPIO™) e dividida nas seguintes fases: desnaturação inicial (98°C/30segundos), desnaturação (98°C/10 segundos), hibridação (56°C/30 segundos) e extensão (72°C/30 segundos) durante 30 ciclos e, um passo de extensão final (72°C/10minutos). Foram feitas várias reações para cada par de *primers*. Cada uma delas constituída por uma mistura com 500 ng de cDNA, 3 µl de primers (20pmol), 10 µl de tampão TF (5X), 3 µl de MgCl₂ (50mM), 1 µl de dNTPs (10mM), 2U/µl de DNA polimerase *Phusion* (Thermo Scientific) e água miliQ até um volume final de 50 µl. Posteriormente, cada reação foi avaliada num gel de agarose a 2% em tampão TAE 1x (Tris base, EDTA 0,5M pH 8,0, ácido acético glacial, água miliQ) por coloração com brometo de etídeo e com recurso ao Chemidoc™ XRS + (Bio-Rad). Na figura 2.1 é apresentado o esquema de conjugação dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) utilizados para

amplificação das diferentes famílias dos domínios dos anticorpos [103]. As tabelas suplementares 6.1 e 6.2 apresentam a sequência de cada um desses *primers*.



● Local de clivagem da SfiI

Figura 2.1 – Combinações de primers *forward* e *reverse* usados para amplificação das diferentes famílias dos domínios VH e VL. Os primers RSCVG-B, RSCVK1, RSCVK2, RSCVK3 e RSCλ1 utilizados nesta primeira ronda de PCR apresentavam sequências capazes de ser reconhecidas pela enzima de restrição SfiI e, simultaneamente, por *primers* de extensão posteriores. Outros *primers* como RSCVH1, RSCVH2, RSCVH3, RSCVH4, RKB9J10-BL, RKB9J0-BL, RKB42BO-BL e RJλ0-BL permitiram gerar caudas complementares que garantiriam a ligação entre os domínios VH e VL numa segunda ronda de PCR.

2.1.2. Purificação dos produtos de PCR

Os produtos de PCR foram purificados em gel de agarose (Low Melting Point) a 2% em TAE 1x e corado com brometo de etídeo. A purificação foi realizada a baixa voltagem ($\pm 66V$). O gel foi visualizado com recurso ao Chemidoc™ XRS + (Bio-Rad) e seleccionada a banda correspondente aos produtos de PCR pretendidos. A banda de interesse foi cortada e o DNA foi extraído do gel com uso do QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Depois de extraído o DNA, procedeu-se à sua precipitação.

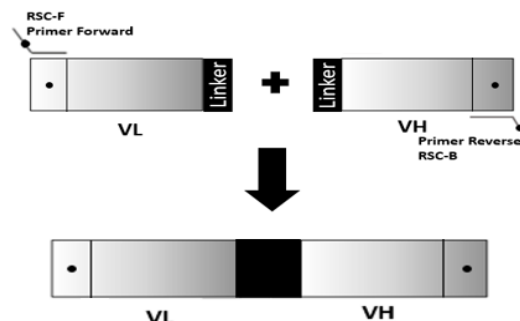
2.1.3. Precipitação dos produtos de PCR

De modo a concentrar os produtos de PCR, precipitou-se o DNA com acetato de sódio. Para isso preparou-se uma mistura constituída por 1/10 de acetato de sódio (CH₃COONa) 3M, 2,5 volumes de etanol (C₂H₆O) gelado absoluto e 1 µl de glicogénio. A mistura foi adicionada ao DNA e incubada durante a noite a -80°C. Após incubação, a mistura foi centrifugada a 13200 rpm durante 1h e a 4°C. O sobrenadante foi descartado e, para lavar, foi adicionado 1 ml de etanol gelado (70%) ao pellet. Realizou-se então uma nova centrifugação na qual o sobrenadante foi removido mais uma vez e o pellet, depois de seco, foi ressuspensionado em 20 µl de água miliQ. A concentração de DNA foi determinada usando o espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific) através da medição da absorvância das amostras.

2.1.4. Amplificação por PCR para ligação dos domínios VH e VL e construção do scFv (2ª ronda de PCR)

A partir dos produtos de PCR recuperados do ponto anterior, os fragmentos correspondentes às diferentes famílias dos domínios VH e VL foram ligados por meio de um *linker* e construída a biblioteca imunizada scFv [103]. Para isso fizeram-se várias reações, cada uma delas constituída por uma mistura com 200 ng de cDNA, 1,6 µl de *primers* (20pmol), 5 µl de tampão GoTaq Flexi (5X), 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de dNTPs (20mM), 5U/µl de DNA polimerase GoTaq Flexi (Thermo Scientific) e água miliQ até um volume final de 25 µl. Posteriormente, cada reação foi avaliada num gel de agarose a 2% em tampão TAE 1x por coloração com brometo de etídeo e com recurso ao

Chemidoc TM XRS + (Bio-Rad). Na figura 2.2 é apresentado o esquema ilustrativo desta etapa bem como a conjugação dos *primers forward* (F) e *reverse* (R) utilizados [103]. A tabela suplementar 6.3 apresenta a sequência de cada um desses *primers*. Os produtos de PCR obtidos deste processo foram também purificados e precipitados como descrito em 2.1.2 e 2.1.3.



● Local de clivagem da SfiI

Figura 2.2 – Representação esquemática relativa à construção da biblioteca imunizada scFv. O *primer* de extensão RSC-F tem a capacidade de reconhecer sequências geradas pelos *primers* RSCVK1, RSCVK2, RSCVK3, RSCλ1 e o *primer* RSC-B por RSCVG-B. Além disso, os *primers* RSC-F e RSC-B vão gerar caudas cujas sequências são reconhecidas pela enzima de restrição SfiI.

2.1.5. Hidrólise do vetor de DNA e dos produtos da 2ª ronda de PCR com a endonuclease de restrição SfiI

De modo a clonar os fragmentos amplificados no vetor apropriado, hidrolisou-se tanto o vetor pComb3X-SS como os produtos de PCR com a enzima de restrição SfiI (Thermo Scientific) [103]. Para a hidrólise dos produtos de PCR, foram utilizados 2 µg de DNA purificado, 60 unidades de endonuclease de restrição SfiI (10U/µl), 28 µl de tampão G (10x) e água miliQ num volume final de 280 µl. Na hidrólise do vetor usaram-se 20 µg de vetor, 60 unidades de endonuclease de restrição SfiI (10U/µl), 20 µl de tampão G (10x) e água miliQ de modo a perfazer um volume final de 200 µl. Ambas as reações foram incubadas a 50°C durante a noite. Posteriormente, o vetor e os produtos de PCR foram purificados num gel de agarose Low Melting Point a 0,8% e 2%, respetivamente. Os fragmentos de interesse foram removidos do gel e purificados com QIAquick® Gel Extraction Kit como descrito anteriormente. Foi então realizada uma nova precipitação e, mais tarde, os produtos foram quantificados usando o espectrofotómetro NanoDrop TM 2000c Spectrophotometer (Thermo Scientific).

2.2. Bibliotecas Phage Display

2.2.1. Clonagem dos produtos de PCR no vetor pComb3X-SS

Para a clonagem da biblioteca scFv no fagemídeo pComb3X-SS foram testados dois rácios distintos. Num rácio de 1:3 utilizaram-se 140 ng de pComb3X-SS, 100 ng de *insert*, 1 µl de endonuclease T4 DNA Ligase (New England BioLabs®), 2µl de tampão ligase (10x) e água miliQ para perfazer um volume de 20 µl. Num rácio de 1:6 usaram-se 140 ng de pComb3X-SS, 200 ng de scFv, 1µl de endonuclease T4 DNA ligase, 2 µl de tampão ligase (10x) e água miliQ para perfazer um volume de 20µl. Foi ainda efetuada uma reação de controlo semelhante às anteriores, mas onde não se colocou o *insert*. As reações foram incubadas durante a noite a 16°C [103]. No dia seguinte, 2µl de cada ligação foram utilizados para transformar 60 µl de células eletrocompetentes *E. coli* TG1

(Lucigen®). Para isso usou-se um eletroporador BioRad MicroPulser™ e as condições utilizadas para a distribuição do pulso elétrico foram 1.8 kV, 25 µF e 200 Ω. A transformação foi efetuada em cuvetes de 1mm de espessura. Imediatamente após o pulso, adicionou-se 1 ml de meio SOC a cada cuvette e todo o conteúdo foi removido e incubado durante 1h a 37°C e 180 rpm.

2.2.2. Confirmação da eficiência de inserção da biblioteca

Para confirmar a eficiência de inserção da biblioteca, uma amostra das bactérias transformadas (diluição 1:10) foi plaqueada em LB-agar + ampicilina (100 mg/ml) e incubada durante a noite a 37°C. No dia seguinte efetuaram-se ensaios de PCR de modo a confirmar a existência do *insert* nos clones obtidos [103]. Para tal escolheram-se colónias bacterianas individuais, as quais foram inoculadas separadamente em 20 µl de água miliQ e incubadas a 94°C durante 5 minutos. Cerca de 5 µl do conteúdo obtido foi aplicado diretamente na reação de PCR. Foram feitas várias reações (uma para cada colónia) cada uma delas constituída por 5µl do extrato bacteriano, 1,6 µl de primer (20pmol), 5 µl de tampão TF (5X), 1,5 µl de MgCl₂ (50mM), 0,5 µl de dNTPs (20mM), 5U/µl de DNA polimerase *Phusion* (Thermo Scientific) e água miliQ até um volume final de 25 µl. Posteriormente, cada reação foi avaliada num gel de agarose a 2% em tampão TAE 1x por coloração com brometo de etídeo e com recurso ao Chemidoc™ XRS + (Bio-Rad). Os *primers* utilizados na reação de PCR foram o RSC-F e RSC-B já mencionados em 2.1.4.

2.2.3. Seleção de anticorpos específicos para a glicoproteína gp120

Paralelamente, a partir das bibliotecas imunizadas de anticorpos de coelho (VH e VL) e, através da técnica de *Phage Display*, procedeu-se à seleção de anticorpos específicos para a glicoproteína gp120. Para isso a biblioteca VL foi incubada durante a noite a 200 rpm e 37°C. No dia seguinte retirou-se 5 ml dessa cultura e adicionou-se a 100 ml de meio SB + ampicilina (100mg/ml). Incubou-se a cultura nas mesmas condições até uma DO (densidade ótica) de aproximadamente 0,6. Em seguida, 100 ml dessa cultura bacteriana foram infetados com 2 ml de fagos *helper* (VCSM13) e fez-se nova incubação durante 30 minutos a 37°C sem agitação. Passados os 15 minutos, a cultura foi incubada durante 2 horas a 37°C e 200 rpm. Posteriormente, e de modo a selecionar as bactérias infetadas pelos fagos *helper*, adicionou-se canamicina (70mg/ml) e incubou-se a cultura *overnight* a 37°C e 200 rpm. Nesse mesmo dia, a gp120 foi imobilizada em 4 poços numa placa de ELISA, a qual ficou a incubar durante a noite a 4°C.

No dia seguinte, transferiu-se a cultura para tubos estéreis de 50 ml e centrifugou-se a 3500 rpm durante 15 minutos e a 4°C. Em seguida procedeu-se à precipitação dos fagos, transferindo-se os sobrenadantes para um *Erlenmeyer* de 500 ml e adicionando 4% de polietilenoglicol 8000 (PEG-8000) e 3% NaCl. Após dissolução dos sólidos o sobrenadante foi incubado no gelo durante 1h. Passada essa hora de incubação, o sobrenadante foi novamente transferido para tubos de 50 ml estéreis e fez-se nova centrifugação a 8000 rpm por 30 minutos a 4°C. O *pellet* fágico foi ressuscitado em 3 ml de PBS e submetido a centrifugação a 8000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Depois de filtrados, os fagos ficaram prontos para ser usados como *INPUT* do primeiro ciclo de seleção. Então, os poços da placa de ELISA revestidos com o antígeno foram lavados com 100 µl de PBS 1x e bloqueados com 100 µl de PBS/BSA 3% durante 1h a 37°C. Após remoção da solução de bloqueio adicionaram-se 100 µl dos bacteriófagos obtidos anteriormente e fez-se um período de incubação durante 2 horas à temperatura ambiente. Após incubação retirou-se a solução fágica dos poços e efetuaram-se lavagens sucessivas com PBS/Tween20 0,2%. Estas lavagens permitiram a remoção dos fagos que não apresentavam anticorpos de elevada afinidade/especificidade para a proteína imobilizada. De modo a recuperar os bacteriófagos que exibiam anticorpos de elevada afinidade para a gp120 e, que por essa razão estavam

fortemente ligados, adicionou-se 100 µl de tripsina (10mg/ml) em PBS 1x e incubou-se 30 minutos a 37°C. Após o tempo de incubação pipetou-se 10 vezes para cima e para baixo e o volume de fagos recolhido (*OUTPUT* do ciclo de seleção) foi guardado num novo tubo estéril. Procedeu-se então à reamplificação dos fagos recolhidos pela infeção de cerca de 4 ml de *E. coli* ER2738 + tetraciclina (5µg/ml) durante 30 minutos, sem agitação e à temperatura ambiente. Terminado o período de incubação, adicionou-se 4 ml de meio SB contendo 4 µl de ampicilina (100mg/ml) e 12 µl de tetraciclina (5mg/ml) e incubou-se durante 1h a 37°C e a 200rpm. Após seleção com ampicilina, procedeu-se a nova infeção com fagos *helper*. Para isso, adicionou-se à cultura 2 ml destes fagos e 91 ml de meio SB contendo 46 µl de ampicilina (100mg/ml) e 184 µl de tetraciclina (5mg/ml) e incubou-se durante cerca de 2 horas a 37°C e 250 rpm. Então, adicionou-se 140 µl de canamicina (50mg/ml) e incubou-se durante a noite a 37°C e 200 rpm. Os bacteriófagos produzidos foram novamente recuperados por precipitação com NaCl e PEG-8000 como descrito anteriormente e utilizados como *INPUT* do ciclo de seleção seguinte. Todo o processo foi repetido para a biblioteca VH.

No total, foram realizados 3 ciclos de seleção para cada biblioteca. Entre os vários ciclos de seleção foram feitas algumas alterações, nomeadamente à quantidade de antígeno em cada um dos poços e ao número de lavagens efetuadas. A tabela 2.1 apresenta as condições utilizadas em cada ciclo de seleção.

Tabela 2.1 - Condições utilizadas nos diferentes ciclos de seleção.

Ciclo de Seleção	1º Ciclo	2º Ciclo	3º Ciclo
Condições	1 µg de antígeno 5 lavagens PBS/Tween20 0,2%	0,5 µg de antígeno 10 lavagens PBS/Tween20 0,2%	0,5 µg de antígeno 12 lavagens PBS/Tween20 0,2%

2.2.3.1. Determinação do *INPUT* e *OUTPUT* dos diferentes ciclos de seleção

Para determinar o *input* de cada um dos ciclos de seleção, 10 µl do *input* de fagos foram diluídos em 1 ml de PBS 1x e, 10 µl dessa diluição, foram diluídos novamente em 1 ml de PBS 1x e, assim sucessivamente, num total de 5 diluições (10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10} , 10^{-12}). Posteriormente, 10 µl de cada uma dessas diluições foram utilizados para infetar 200 µl de *E. coli* ER2738 em crescimento exponencial e incubados durante 30 minutos a 37°C sem agitação. Findo o período de incubação, as diferentes culturas, correspondentes a cada uma das diluições, foram plaqueadas em LB-Agar + ampicilina. Para determinar o *output* dos diferentes ciclos de seleção diluiu-se 2 µl da cultura de reamplificação (mencionada em 2.2.3. e constituída por 4 ml de *E. coli* ER2738 e pelo *output* de fagos recolhido) em 200 µl de PBS 1x. Então, 10 µl e 100 µl dessa diluição foram plaqueados em LB-Agar + ampicilina. Como controlos negativos foram plaqueados 200 µl de *E. coli* ER2738 em LB Agar + ampicilina e LB-Agar + canamicina. Como controlo positivo plaqueou-se 200 µl de *E. coli* ER2738 em LB-Agar + tetraciclina. Todas as placas foram incubadas durante a noite a 37°C. No dia seguinte, contaram-se as colónias existentes em cada placa para estimar o *input* e *output* obtidos para os diferentes ciclos.

2.3. Caracterização dos anticorpos anti-gp120 obtidos e determinação da diversidade das bibliotecas imunizadas VH e VL

Os clones do *output* do 3ºciclo de seleção foram então sequenciados de modo a avaliar o seu perfil e diversidade. Para isso prepararam-se diferentes amostras, todas elas constituídas por 10 µl de DNA do clone e 10 µl de *primer* pComb3X ATG. A sequência inerente a cada um dos clones foi

determinada pela empresa *GATC BIOTECH*. Posteriormente, para traduzir as sequências de ácidos nucleicos obtidas em sequências de aminoácidos recorreu-se ao *software ExPASy Bioinformatics*. As diferentes sequências foram então introduzidas no *software Vector NTI* e, depois de alinhadas, determinada a sua similaridade. Foram ainda construídas árvores filogenéticas com base no método *Neighbor Joining* tendo em consideração uma sequência *consensus* automaticamente gerada pelo *software*.

Por meio da tecnologia de NGS determinou-se ainda a diversidade das bibliotecas imunizadas VH e VL usadas no *Phage Display*. As sequências de DNA que constituíam cada uma das bibliotecas foram determinadas pela empresa *STAB VIDA*. Em seguida, para o tratamento dessas sequências utilizou-se o *software Geneious Prime (Biomatters)* o qual permitiu a tradução das diferentes sequências de nucleótidos em sequências aminoacídicas e seleção das sequências de interesse por comparação com uma sequência de referência. O *software Jupyter Notebook*, por meio de um *script* em linguagem *python* (João Carriço, Instituto de Medicina Molecular João Lobo Antunes), possibilitou a contagem do número de representantes associado a cada uma das sequências.

2.4. Ensaio de expressão e ligação à proteína alvo

A caracterização filogenética dos clones obtidos permitiu determinar a diversidade e similaridade dos clones isolados. Entre esses clones foi necessário identificar quais os que apresentavam elevada expressão e, em simultâneo, elevada capacidade de ligação à glicoproteína gp120. Para isso, picaram-se diferentes colónias do *output* do 3º ciclo de seleção e, com recurso ao QIAprep® Spin Miniprep Kit, foi extraído o DNA de cada um dos clones. Este DNA foi então utilizado na transformação de *E. coli* TOP10F (como descrito em 2.2.1.). No dia seguinte, picou-se uma colónia representativa de cada um dos clones, fizeram-se diferentes inóculos em meio SB + ampicilina (100mg/ml) e incubou-se *overnight* a 37°C e 200rpm. Posteriormente, os diferentes inóculos foram diluídos (1:30) em SB + ampicilina (100mg/ml) e incubados a 37°C e 200rpm até uma DO de aproximadamente 0,6. Adicionou-se então IPTG (*Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*), um indutor de expressão proteica, a cada um dos inóculos. A indução da expressão foi feita a 19°C. Retiraram-se três amostras dos diferentes inóculos em três *timepoints* distintos (0 horas, 5 horas e *overnight*), representativos do tempo de incubação de cada um dos inóculos com o indutor. As diferentes amostras retiradas em cada um dos *timepoints* foram submetidas a um período de incubação durante 5 minutos em gelo (de forma a parar o processo de indução) e a uma centrifugação a 13200rpm durante 10 minutos a 4°C. O processo de centrifugação permitiu a deposição do *pellet* bacteriano e a remoção do meio de cultura. Ressuspendeu-se o *pellet* bacteriano de cada um dos clones em 200 µl de BugBuster® Protein Extraction Reagent (Merck) + anti-protease Complete EDTA-free (Roche) e incubou-se durante 1h à temperatura ambiente. Seguiu-se um novo processo de centrifugação a 13200 rpm por 15 minutos a 4°C. O sobrenadante, rico em anticorpos, foi recuperado e utilizado em ensaios como ELISA e *Western Blot*.

2.4.1. Avaliação da expressão e ligação à proteína alvo por meio de ELISA

O ensaio de ELISA permitiu avaliar três aspetos fundamentais: o nível de expressão de cada um dos anticorpos, a capacidade dos mesmos para ligação ao antígeno e a existência de ligações inespecíficas. Para analisar a capacidade de ligação dos anticorpos à gp120, no dia anterior ao ensaio de ELISA, foi efetuada a ligação do antígeno à placa de 96 poços. Para isso foram adicionados 100 ng da glicoproteína gp120 em PBS1x a cada um dos poços e incubou-se a placa *overnight* a 4°C. No dia seguinte, a placa já com o antígeno ligado, foi lavada 3x com PBS 1x e adicionada uma solução de bloqueio PBS/BSA3%, seguindo-se um período de incubação de 1 hora a 37°C. Efetuou-se

seguidamente uma nova lavagem de 5x com PBS1x, adicionou-se o sobrenadante com cada um dos clones e fez-se um novo período de incubação durante 1 hora a 37°C. Seguiram-se mais 5 lavagens com PBS 1x, adicionou-se o anticorpo secundário anti-HA-HRP (Roche) e incubou-se a placa durante mais 1 hora a 37°C. Foram feitas 5 lavagens adicionais com PBS 1x e adicionou-se ABTS (2,2'-azino-bis (3- ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)). As leituras da DO a 415nm realizaram-se após 30 e 45 minutos. O soro do coelho imunizado e anticorpo anti-coelho foram usados como controlo positivo. Extrato de *E. coli* TOP10F foi utilizado como controlo negativo. A inespecificidade da ligação foi avaliada numa outra placa pela adição de PBS/BSA3%, sujeita ao mesmo procedimento, mas onde o antígeno em estudo estava ausente. Para avaliar a expressão dos anticorpos, efetuou-se o processo descrito anteriormente, com exceção da ligação da proteína alvo à placa. Neste caso como controlos positivos foram utilizados 2 anticorpos cuja capacidade de expressão já tinha sido testada anteriormente. Após análise dos valores de DO de todas as placas, foram escolhidos os clones que apresentaram valores mais elevados de expressão e ligação à proteína alvo.

2.4.2. Avaliação da expressão dos diferentes clones selecionados por meio de *Western Blot*

Para avaliar a expressão dos diferentes clones foi ainda realizado um *Western Blot*. Prepararam-se géis de SDS-PAGE 15% onde foram carregados os clones provenientes de cada um dos *timepoints* (0 horas, 5 horas e *overnight*). Concluída a eletroforese e após separação das diferentes proteínas, procedeu-se à transferência dos vários géis para membranas de nitrocelulose. Para o processo de transferência procedeu-se à montagem dos vários constituintes pela seguinte ordem: esponja-papel de filtro-gel-membrana-papel de filtro-esponja. Após a transferência, a membrana foi lavada com PBS1x e incubada numa solução de bloqueio constituída por 5% leite em PBS/Tween20 0,2% durante 1 hora à temperatura ambiente e em agitação. A membrana foi então lavada 3 vezes apenas com PBS/Tween20 0,2% durante 10 minutos e incubada com o anticorpo secundário anti-HA-HRP. Após incubação fizeram-se 5 lavagens adicionais durante 15 minutos em PBS/Tween20 0,2% e, posteriormente em água miliQ durante 1 a 2 minutos. Para deteção utilizou-se LuminataTM (Merck) e a membrana foi visualizada no ChemidocTM XRS + (Bio-Rad).

3. Resultados e discussão

3.1. Construção da biblioteca de anticorpos (scFv)

3.1.1. Amplificação por PCR dos genes que codificam para os domínios VH e VL dos anticorpos (1ª ronda de PCR)

A partir das bibliotecas imunizadas VH e VL já construídas procedeu-se à amplificação dos genes que codificam para os domínios VH e VL dos anticorpos. Para isso, utilizaram-se *primers* específicos (tabelas suplementares 6.1 e 6.2), de modo a amplificar as diferentes famílias destes domínios. Para as várias famílias de VL e VH são esperados fragmentos com um peso molecular de 350pb e 400pb, respetivamente [103]. Como observado na figura 3.1 os fragmentos obtidos apresentam um peso molecular de acordo com o esperado. Todas as famílias foram amplificadas corretamente e em quantidade suficiente.

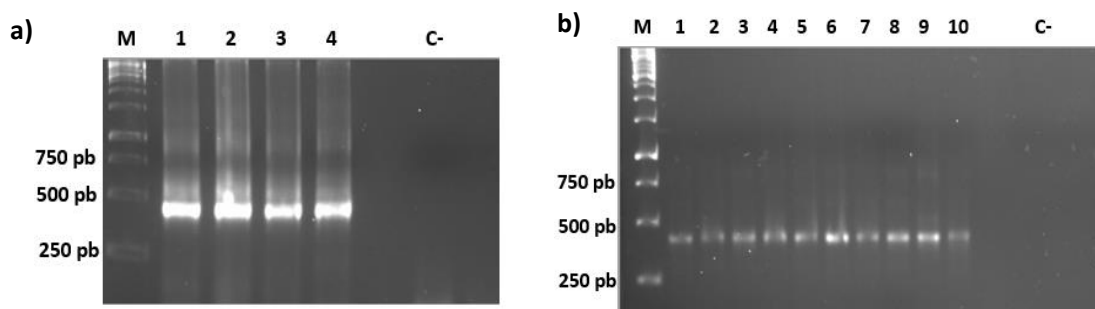


Figura 3.1 – Amplificação por PCR dos genes que codificam para as diferentes famílias dos domínios VH e VL. a) Gel 2% agarose após amplificação por PCR dos genes que codificam para as diferentes famílias do domínio VH. M: Marcador de peso molecular (1kb), 1: RSCVH1+RSCVG-B, 2: RSCVH2 + RSCVG-B, 3: RSCVH3+RSCVG-B, 4: RSCVH4+RSCVG-B, C: Controlo negativo (sem DNA). b) Gel 2% agarose após amplificação por PCR dos genes que codificam para as diferentes famílias do domínio VL. M: Marcador de peso molecular (1kb), 1: RSCVK1+RKB9J10-BL, 2: RSCVK1+RKB9J0-BL, 3: RSCVK1+RKB42JO-BL, 4: RSCVK2+RKB9J10-BL, 5: RSCVK2+RKB9J0-BL, 6: RSCVK2+RKB42JO-BL, 7: RSCVK3+RKB9J10-BL, 8: RSCVK3+RKB9J0-BL, 9: RSCVK3+RKB42JO-BL, 10: RSC λ 1+ RJ λ 0-BL, C: Controlo negativo (sem DNA).

3.1.2. Purificação dos produtos de PCR (1ª ronda)

Os produtos de PCR foram purificados em gel de agarose e o DNA foi recuperado com recurso ao QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Os géis obtidos da purificação das diferentes famílias de VH e VL encontram-se representados nas figuras 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5. As tabelas 3.1 e 3.2 discriminam as quantidades recuperadas das diferentes famílias após o processo de purificação.

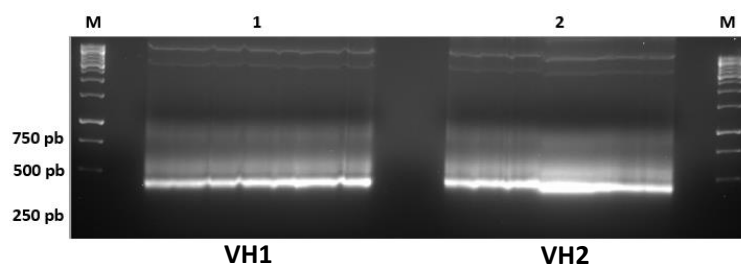


Figura 3.2 – Géis de agarose a 2% referentes à purificação dos fragmentos correspondentes às famílias VH1 e VH2 dos domínios VH. M: Marcador de peso molecular (1kb); 1: RSCVH1 + RSCVG-B, 2: RSCVH2 + RSCVG-B.

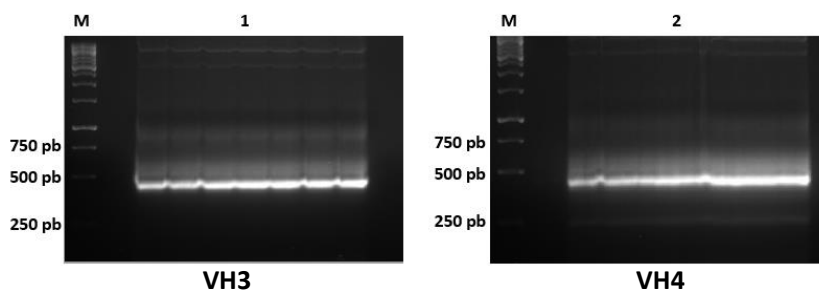


Figura 3.3 – Géis de agarose a 2% referentes à purificação dos fragmentos correspondentes às famílias VH3 e VH4 dos domínios VH. M: Marcador de peso molecular (1kb); 1: RSCVH3 + RSCVG-B e 2: RSCVH4 + RSCVG-B.

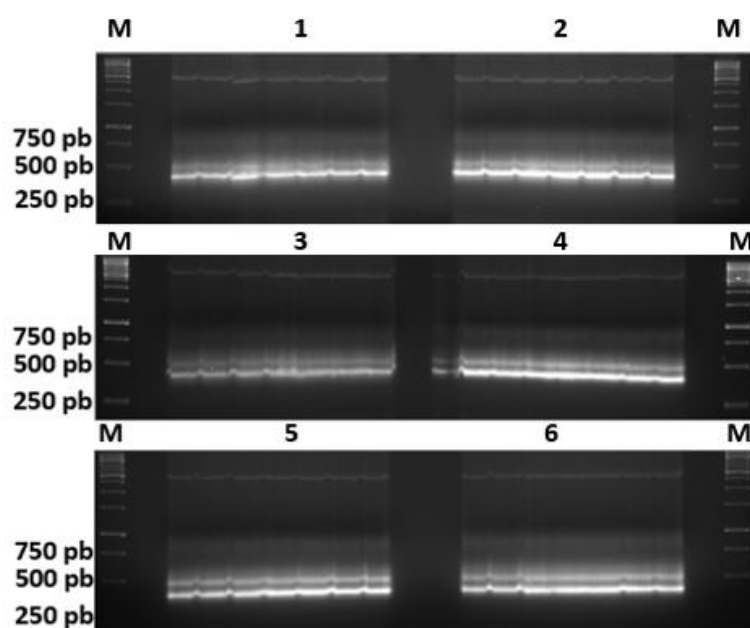


Figura 3.4 – Géis de agarose a 2% referentes à purificação dos fragmentos correspondentes às famílias K1 e K2 dos domínios VL. M: Marcador de peso molecular (1kb), 1: RSCVK1+RKB9J10-BL, 2: RSCVK1+RKB9J0-BL, 3: RSCVK1+RKB42JO-BL, 4: RSCVK2+RKB9J10-BL, 5: RSCVK2+RKB9J0-BL, 6: RSCVK2+RKB42JO-BL.

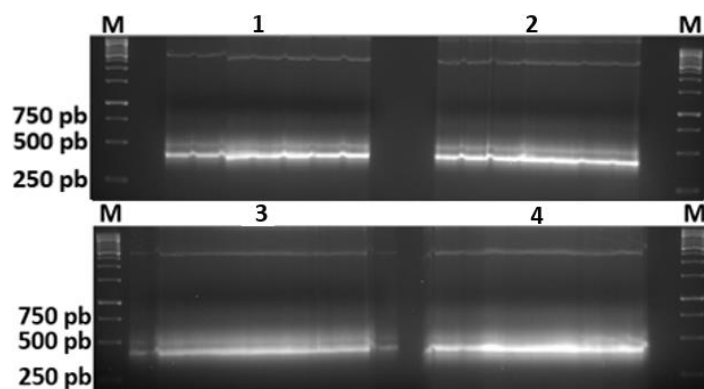


Figura 3.5 – Géis de agarose a 2% referentes à purificação dos fragmentos correspondentes às famílias K3 e Lambda dos domínios VL. M: Marcador de peso molecular (1kb), 1: RSCVK3+RKB9J10-BL, 2: RSCVK3+RKB9J0-BL, 3: RSCVK3+RKB42JO-BL e 4: RSC λ 1+ RJ λ 0-BL.

Tabela 3.1 – Volumes finais (μ l) obtidos após amplificação das diferentes famílias dos domínios VH e quantidade de DNA recuperada após a purificação (ng).

Diferentes famílias dos domínios VH	Volume (μ l)	Quantidade recuperada após a purificação (ng)
RSCVH1 + RSCVG-B	500 μ l	4408 ng
RSCVH2 + RSCVG-B	750 μ l	8204 ng
RSCVH3 + RSCVG-B	500 μ l	4838 ng
RSCVH4 + RSCVG-B	750 μ l	5588 ng

Tabela 3.2 – Volumes finais (μl) obtidos após amplificação das diferentes famílias dos domínios VL e quantidade de DNA recuperada após a purificação (ng).

Diferentes famílias dos domínios VL	Volume (μl)	Quantidade recuperada após a purificação (ng)
RSCVK1 + RKB9J10-BL	450 μl	2260 ng
RSCVK1 + RKB9J0-BL	450 μl	2852 ng
RSCVK1 + RKB42BO-BL	300 μl	1466 ng
RSCVK2 + RKB9J10-BL	300 μl	2906 ng
RSCVK2 + RKB9J0-BL	300 μl	2634 ng
RSCVK2 + RKB42BO-BL	300 μl	1832 ng
RSCVK3 + RKB9J10-BL	300 μl	2610 ng
RSCVK3 + RKB9J0-BL	350 μl	2092 ng
RSCVK3 + RKB42BO-BL	600 μl	1192 ng
RSCλ1 + RJλ0-BL	450 μl	1742 ng

3.1.3. Amplificação por PCR para ligação dos domínios VH e VL e construção do scFv (2ª ronda de PCR)

Após purificação e precipitação, o DNA das diferentes famílias dos domínios de interesse foi recuperado e utilizado numa nova ronda de PCR. Esta segunda ronda de amplificação, através do uso de uma nova combinação de *primers* (tabela suplementar 6.3), permitiu a ligação entre os domínios VH e VL e construção da biblioteca scFv. Para o scFv são esperados fragmentos com um peso molecular de aproximadamente 750pb [103]. Como observado na figura 3.6 o peso dos fragmentos obtidos está de acordo com o esperado.

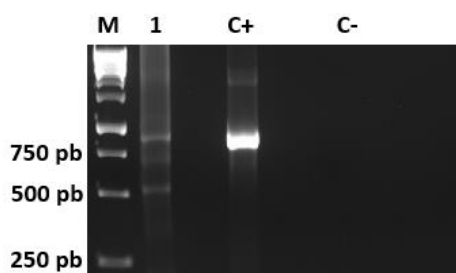


Figura 3.6 – Gel de agarose 1,5% referente à amplificação por PCR para ligação dos domínios VH e VL e construção do scFv. M: Marcador de peso molecular (1kb), 1: scFv (RSC-F e RSC-B), C+: Controlo positivo de peso molecular e C-: Controlo negativo (sem DNA).

3.1.4. Purificação dos produtos de PCR (2ª Ronda)

Os novos produtos de PCR foram purificados em gel de agarose (figura 3.7) e o DNA foi novamente recuperado com recurso ao QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen). Deste processo de purificação resultaram 11157 ng de DNA num volume total de 240 μl.

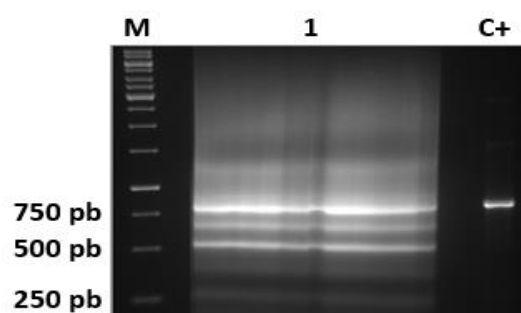


Figura 3.7 – Gel de agarose a 1,5% referente à purificação do scFv. M: Marcador de peso molecular (1kb), 1: scFv (RSC-F e RSC-B), C+: Controlo positivo de peso molecular.

3.2. Bibliotecas *Phage Display*

3.2.1. Clonagem dos produtos de PCR no vetor pComb3X-SS

Em seguida, o DNA recuperado foi hidrolisado com a endonuclease de restrição *SfiI* e novamente purificado em gel de agarose (figura 3.8). A *SfiI* reconhece a sequência GGCCNNNN[^]NGGCC e apresenta uma maior eficiência de corte à temperatura de 50°C. Deste processo de purificação resultaram 2049 ng de DNA num volume total de 150 µl.

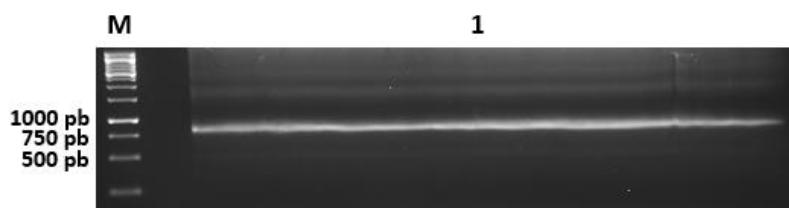


Figura 3.8 – Gel de agarose a 1,5% referente à purificação do scFv após hidrólise com a endonuclease de restrição *SfiI*. M: Marcador de peso molecular (1kb), 1: scFv (RSC-F e RSC-B).

O vetor pComb3X-SS foi também hidrolisado com a mesma endonuclease e igualmente purificado (figura 3.9). O *Stuffer* e o fagemídeo hidrolisado correspondem aos fragmentos de 1600pb e 3400pb, respetivamente [103].

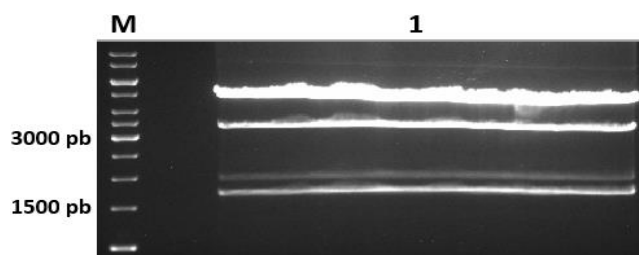


Figura 3.9 – Gel de agarose 0,8% da purificação do vetor pComb3X-SS após hidrólise com enzima de restrição *SfiI*. M: Marcador de peso molecular (1kb), 1: pComb3X-SS hidrolisado com enzima de restrição.

Posteriormente, a biblioteca scFv foi clonada no vetor pComb3X-SS. Para isso, efetuaram-se ligações com diferentes proporções de vetor e *insert* (1:3 e 1:6, respetivamente), as quais foram transformadas por forma a avaliar qual garantia uma maior quantidade de transformantes. Para confirmar a eficiência de transformação, uma vez que esta é um fator limitante do tamanho de uma

biblioteca de anticorpos, realizou-se uma nova reação de PCR. Analisaram-se 10 clones de cada uma das transformações e verificou-se a presença do *insert* em todos eles (banda a 750pb correspondente ao tamanho dos fragmentos scFv), concluindo-se assim que houve uma eficiência de transformação de 100% (figura 3.10). No que diz respeito à diversidade de uma biblioteca derivada de animais imunizados sabe-se que esta deve variar entre 10^7 e 10^8 [103]. A biblioteca scFv apresentou uma diversidade de aproximadamente 10^7 , pelo que se pode concluir que foi eficientemente construída. Esta biblioteca será posteriormente usada na seleção de anticorpos anti-gp120.

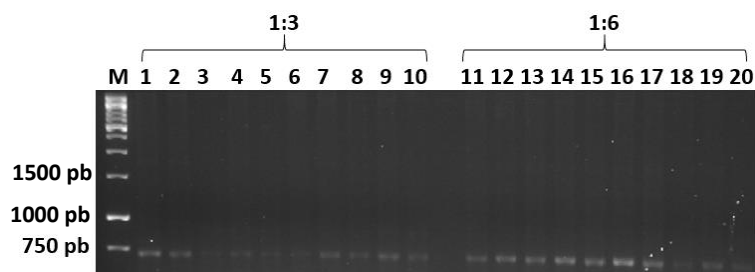


Figura 3.10 – Gel de agarose a 1,5% com os produtos de PCR resultantes da amplificação dos *inserts* clonados (M: Marcador de peso molecular (1kb), 1 a 10: clones (rácio 1:3), 11 a 20: clones (rácio 1:6).

3.2.2. Seleção de anticorpos de elevada especificidade para a glicoproteína gp120 por *Phage Display*

Paralelamente à construção da biblioteca scFv iniciou-se a selecção por *Phage Display* onde se fez uso das bibliotecas imunizadas VH e VL já anteriormente construídas. O processo de selecção foi realizado separadamente para cada uma das bibliotecas. Em cada ciclo de selecção, os fagos que exibem à sua superfície os diferentes anticorpos (*input*) foram incubados com o antígeno (glicoproteína gp120). Os fagos não ligados ou fracamente ligados à gp120 foram então eliminados por lavagem com PBS/Tween20 0,2%. Já os fagos fortemente ligados foram recuperados (*output*) com recurso a tripsina e depois novamente amplificados por infecção de *E. coli*. Após reamplificação, os fagos foram utilizados como *input* do ciclo seguinte num total de três ciclos de selecção. Este processo é descrito com maior detalhe em 2.2.3..

3.2.2.1. Determinação do *INPUT* e *OUTPUT* dos diferentes ciclos de selecção

Para os diferentes ciclos de selecção, é possível observar que o título de fagos de saída (*output*) é sempre inferior ao título de fagos de entrada (*input*), conforme esperado [103]. A respeito da biblioteca VL, verifica-se uma redução significativa do número de fagos obtidos (*output*) na passagem do 2º ciclo para o 3º ciclo de selecção. Esta redução deve-se a um aumento da estringência do processo de selecção devido ao aumento do número de lavagens efetuadas (12 vezes). No que diz respeito à biblioteca VH, o decréscimo mais acentuado surge na passagem do 1º para o 2º ciclo de selecção, onde mais uma vez se aumentou a estringência, neste caso pela redução da quantidade de antígeno (1µg para 0,5µg) e aumento do número de lavagens para 10 vezes.

Em suma, aquando da realização dos diferentes ciclos de selecção foram alteradas algumas condições, nomeadamente a quantidade de antígeno e o número de lavagens a efetuar em cada ciclo. Estas alterações garantiram um aumento da estringência em cada um dos ciclos o que resultou na selecção de domínios de anticorpos de elevada atividade de ligação e especificidade para a glicoproteína em estudo. A tabela 3.3 e a figura 3.11 apresentam os resultados obtidos (*INPUT* e *OUTPUT*) em cada ciclo de selecção para cada uma das bibliotecas em análise.

Tabela 3.3 – Valores obtidos para o *INPUT* e *OUTPUT* nos diferentes ciclos de seleção para as bibliotecas imunizadas VH e VL.

	1º Ciclo de Seleção		2º Ciclo de Seleção		3º Ciclo de Seleção	
	VH	VL	VH	VL	VH	VL
INPUT (fagos/ml)	2×10^{10}	2×10^{10}	1×10^8	1×10^8	1×10^{10}	1×10^{10}
OUTPUT (fagos/ml)	$10,8 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$\pm 10^2$	5×10^4	4×10^3	$\pm 10^2$

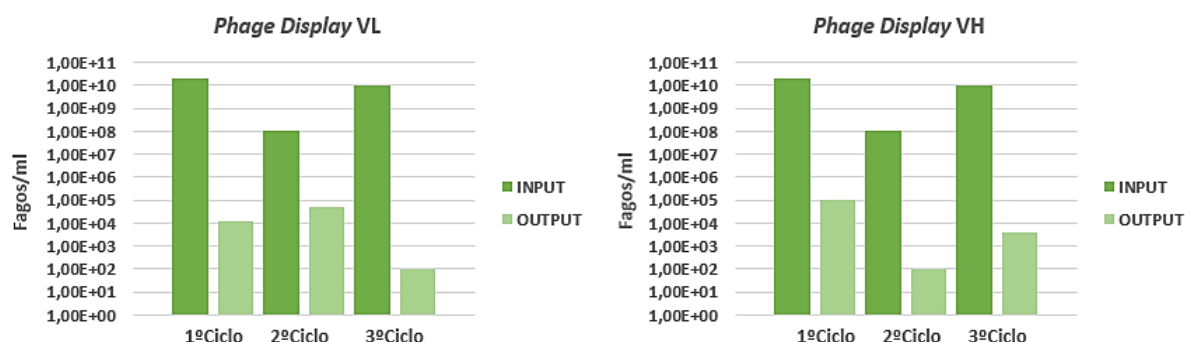


Figura 3.11 – Relação *INPUT* e *OUTPUT* nos três ciclos efetuados para a seleção de domínios de anticorpos VH e VL específicos para a glicoproteína gp120

Apesar de terem sido selecionados anticorpos com proveniência de ambas as bibliotecas optou-se por seguir apenas com os domínios VL. Estes domínios geralmente apresentam maior estabilidade e menor risco de agregação pelo que são mais promissores para o desenvolvimento de anticorpos recombinantes [109].

3.3. Caracterização dos sdAbs anti-gp120

Finalizado o *Phage Display*, as sequências dos clones VL selecionados foram alinhadas e, posteriormente, determinada a sua similaridade. A partir desta análise e, tendo em conta todas as sequências obtidas, foi encontrada uma sequência *consensus*. Esta sequência *consensus* permitiu a construção de uma árvore filogenética capaz de determinar a similaridade entre os diversos clones e, consequentemente, avaliar quantos clones diferentes foram selecionados após seleção por *Phage Display*. Tendo em conta esta análise e com base na nomenclatura de Kabat, foi possível encontrar em cada sequência as regiões correspondentes aos CDRs [110]. A identificação dos resíduos que compõem estes últimos tem por base a localização das FRs, regiões altamente conservadas que antecedem e precedem os CDRs, facilitando a sua identificação. Nos domínios VL o CDR1 é precedido por uma cisteína conservada (C) e seguido por um triptofano (W) o qual é normalmente seguido por uma tirosina (Y). O CDR2 é quase sempre composto por sete resíduos e é precedido e seguido por uma tirosina e glicina (G), respetivamente. O CDR3 é precedido por uma cisteína conservada e seguido por um par de resíduos fenilalanina e glicina (FG). Como expectável, os CDRs são as regiões que apresentam maior variabilidade entre os clones, sendo a CDR3 a região mais variável, seguida pela CDR1 e, por último, a CDR2. A elevada variabilidade destas regiões é resultante do processo de maturação por afinidade que ocorreu no sistema imunológico do coelho [103]. As sequências dos diferentes clones, a árvore filogenética construída com base nessas

sequências e a localização das regiões correspondentes aos CDRs em cada um dos clones encontram-se representadas na figura 3.12.

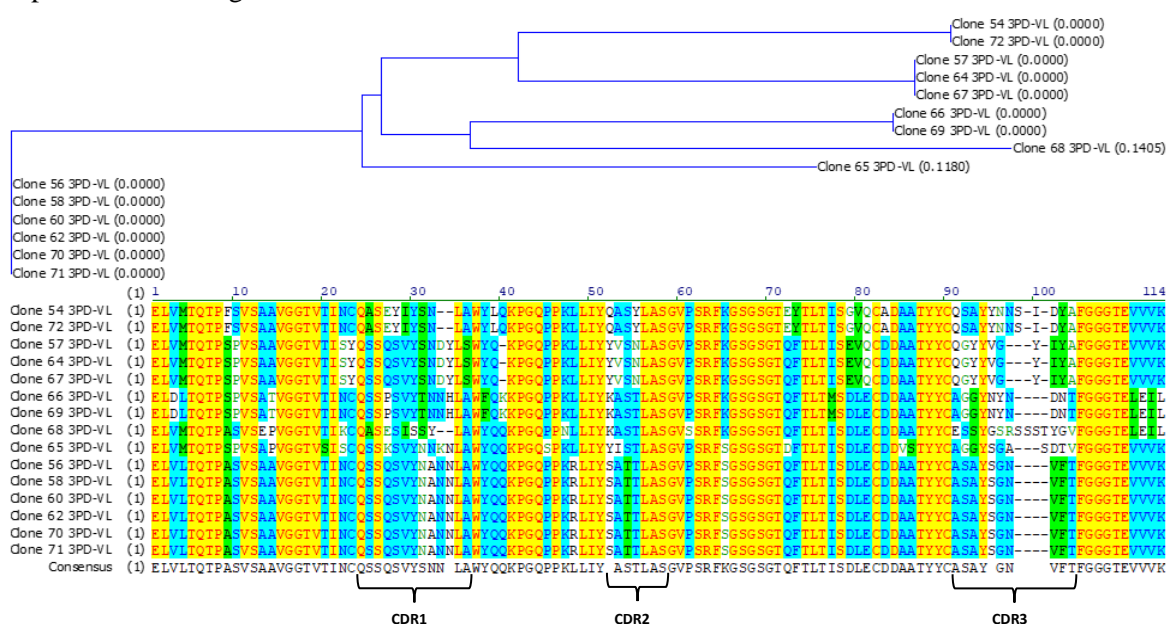


Figura 3.12 – Diferentes sequências dos vários clones selecionados após o *Phage Display* e construção da respetiva árvore filogenética.

É de salientar ainda que a sequenciação dos clones selecionados permitiu também identificar a família de anticorpos em que estes se inserem. A família K1 foi sem dúvida a mais representada, seguindo-se-lhe a família K2. Estes mesmos resultados estão em concordância com outro trabalho já desenvolvido no grupo e em que se fez uso desta mesma biblioteca VL imunizada [111]. Para as famílias K3 e Lambda não foram identificados quaisquer clones. Por último, com base na informação fornecida pela árvore filogenética é possível concluir que os vários clones selecionados podem ser organizados em seis grupos. O grupo de clones 56 3PD-VL, 58 3PD-VL, 60 3PD-VL, 62 3PD-VL, 70 3PD-VL e 71 3PD-VL é o mais representado, seguindo-se-lhe o grupo de clones 57 3PD-VL, 64 3PD-VL e 67 3PD-VL.

3.4. Determinação da diversidade das bibliotecas imunizadas VH e VL

As bibliotecas imunizadas VH e VL foram também analisadas individualmente, tendo sido determinadas todas as diferentes sequências de anticorpos que as constituem bem como o número de vezes que cada uma dessas sequências surge representada. Assim, foi possível traçar o perfil de diversidade de cada uma destas bibliotecas (figura 3.13). Tendo por base os resultados obtidos, é possível inferir que as bibliotecas VH e VL apresentam diferentes perfis de diversidade. Enquanto na biblioteca VL existem sequências maioritariamente representadas, na biblioteca VH todas as sequências surgem em proporção semelhante.

A análise da biblioteca VL demonstrou, como esperado, que os clones selecionados aquando do *Phage Display* integram esta biblioteca. Embora estes clones não sejam os mais representados na biblioteca, a sua seleção demonstra que a tecnologia de *Phage Display* permitiu selecionar clones que embora não estejam tão representados possam ser mais específicos e promissores para o desenvolvimento de anticorpos para o alvo pretendido, neste caso a gp120.

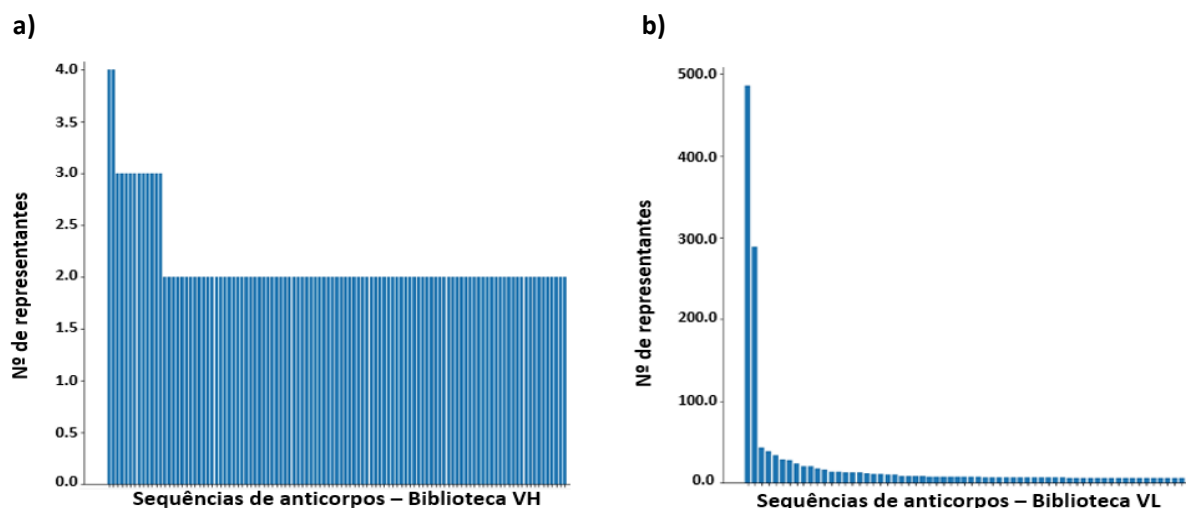


Figura 3.13 – Representação gráfica da diversidade das bibliotecas imunizadas de anticorpos de coelho. a) Biblioteca imunizada VH b) Biblioteca imunizada VL.

3.5. Ensaio de expressão e ligação à proteína alvo

3.5.1. Avaliação da expressão e ligação à proteína alvo por meio de ELISA

Em seguida, testou-se a capacidade de ligação dos clones selecionados à proteína alvo. A indução da expressão dos diferentes clones foi realizada à temperatura de 19°C e a capacidade de ligação à gp120 foi testada a partir do extrato proteico recolhido 5 horas após indução da expressão e *overnight* (figura 3.14). Tendo em conta os resultados obtidos, os clones 66 3PD-VL, 68 3PD-VL e 65 3PD-VL parecem ser os mais promissores pois apresentam uma maior atividade de ligação à glicoproteína gp120.

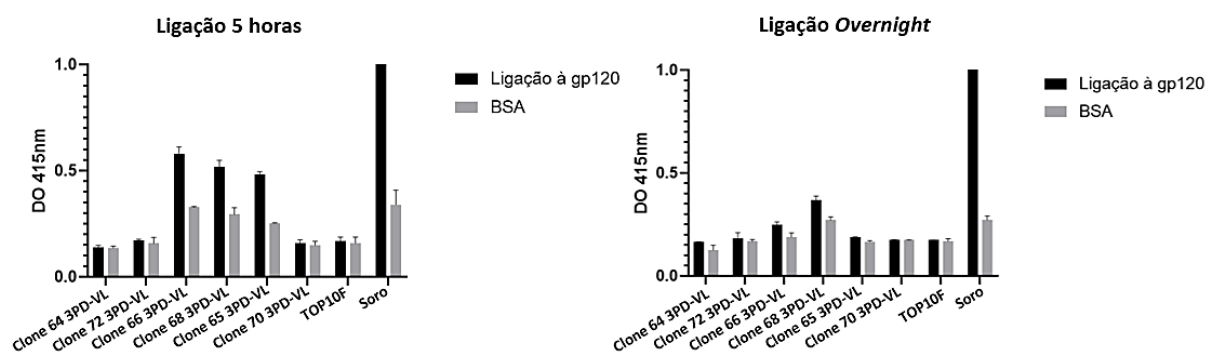


Figura 3.14 – Avaliação da capacidade de ligação dos clones selecionados à glicoproteína gp120 (indução a 19°C). Extrato de células TOP10F e o soro do coelho imunizado foram utilizados como controlo negativo e positivo, respetivamente. Em cada um dos ensaios utilizou-se ainda BSA a qual forneceu informações sobre a inespecificidade das ligações. Os valores apresentados representam a média \pm desvio padrão de ensaios em duplicado para cada condição e onde foram obtidos resultados semelhantes.

O extrato proteico recolhido nos diferentes *timepoints* foi ainda utilizado num outro ensaio de ELISA. Esse ensaio teve por objetivo avaliar a capacidade de expressão de cada um dos clones em estudo. Os clones que melhor expressam (figura suplementar 6.4) coincidem com aqueles que apresentam uma maior capacidade de ligação à gp120 (figura 3.14).

3.5.2. Avaliação da expressão dos diferentes clones selecionados por meio de *Western Blot*

A expressão dos seis clones em estudo à temperatura de 19°C nos diferentes *timepoints* foi ainda avaliada por *Western Blot* (figura 3.15). O *Western Blot* aponta os clones 66 3PD-VL, 68 3PD-VL e 65 3PD-VL como os que apresentam uma maior expressão. Estes mesmos clones foram igualmente apontados em 3.5.1. como os que melhor expressam e melhor ligam à glicoproteína em estudo. Será ainda necessário otimizar as condições de expressão para os restantes clones, nomeadamente para o grupo de clones 56 3PD-VL, 58 3PD-VL, 60 3PD-VL, 62 3PD-VL, 70 3PD-VL e 71 3PD-VL pois é apontado em 3.3 como o grupo de clones mais representado.

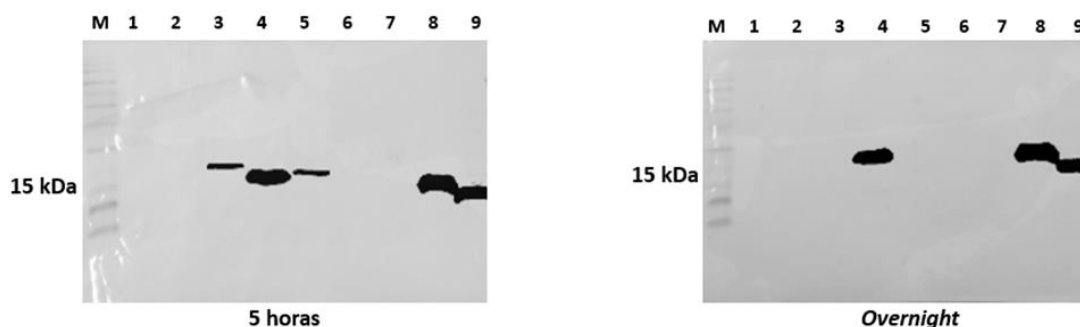


Figura 3.15 - *Western Blot* relativo à expressão dos clones selecionados (indução a 19°C). M: Marcador de peso molecular, 1: Clone 64 3PD-VL, 2: Clone 72 3PD-VL, 3: Clone 66 3PD-VL, 4: Clone 68 3PD-VL, 5: Clone 65 3PD-VL, 6: Clone 70 3PD-VL, 7: Extrato TOP10F (controlo negativo), 8: Clone #1 (controlo positivo), 9: Clone #19 (controlo positivo).

4. Conclusões e perspetivas futuras

O VIH afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Grande parte das estratégias disponíveis para controlo da progressão da infeção por VIH têm como alvo as enzimas virais e visam essencialmente a interrupção do processo replicativo do vírus. No entanto, o aparecimento de formas virais resistentes às terapias atuais e a toxicidade associada ao seu uso contínuo têm destacado a necessidade de desenvolvimento de novas abordagens. A caracterização dos mecanismos subjacentes à entrada do vírus na célula hospedeira permitiu identificar potenciais novos alvos para intervenção. Assim, surgiu uma nova classe de fármacos, os inibidores de entrada. Estas moléculas visam componentes virais (gp120 ou gp41) ou celulares (CD4, CCR5 ou CXCR4) intervenientes no processo de entrada e bloqueiam os eventos iniciais que promovem o estabelecimento da infeção. A glicoproteína gp120 devido ao seu papel fundamental neste processo, em particular na ligação do vírus à célula alvo, apresenta-se como um alvo altamente promissor. Neste sentido, o objetivo deste trabalho prendeu-se com o desenvolvimento de um inibidor de entrada, de caráter biológico, específico para esta glicoproteína. Em particular, pretendia-se obter um anticorpo capaz de interagir com o epítipo da gp120 responsável pela ligação ao recetor celular CD4. É de recordar que o local da gp120 que se liga a CD4 é uma das poucas regiões conservadas desta glicoproteína e que a ligação gp120-CD4 é a primeira etapa no processo de infeção. Assim, esta estratégia, quando implementada, não só apresentará aplicabilidade terapêutica, mas também profilática.

Por forma a ir de encontro ao objetivo pretendido construíram-se bibliotecas imunizadas de anticorpos de coelho e procedeu-se à identificação de anticorpos específicos para a glicoproteína gp120 com recurso à técnica de *Phage Display*. Posteriormente, os clones selecionados foram sequenciados tendo-se analisado a similaridade entre eles. A sequenciação dos vários clones permitiu

determinar que foram selecionados seis clones diferentes. Esses mesmo clones foram utilizados em ensaios de expressão e ligação à proteína alvo. Entre os seis clones selecionados três deles (clone 66 3PD-VL, clone 68 3PD-VL e clone 65 3PD-VL) apresentaram uma boa capacidade de expressão e ligação à gp120.

Os resultados alcançados neste projeto foram bastante promissores. Além dos estudos já efetuados, a fim de caracterizar os anticorpos selecionados, será importante realizar estudos adicionais. Será necessário clonar os genes dos anticorpos selecionados em vetores apropriados para expressão, otimizar as condições de expressão dos vários anticorpos e proceder à sua purificação. Será também fundamental mapear os locais da molécula alvo com os quais os anticorpos selecionados interagem e testar se algum desses anticorpos é capaz de interagir com o epítipo responsável pela ligação ao recetor CD4. Dever-se-ão ainda realizar ensaios celulares e estudos de neutralização do VIH para verificar se os anticorpos selecionados são capazes de inibir a ligação gp120-CD4 e, por conseguinte, o processo de infeção. A biblioteca scFv construída será utilizada futuramente num novo *Phage Display*. Os clones selecionados a partir desta biblioteca, no formato scFv, serão igualmente testados de forma a avaliar se constituem uma alternativa mais promissora do que os domínios VL e VH isoladamente. Por último, os anticorpos mais promissores serão então clonados com os anticorpos anti-gp41 já selecionados com o objetivo de desenvolver um anticorpo biespecífico gp120-gp41 contra o VIH-1.

5. Referências Bibliográficas

- [1] Melhuish A, Lewthwaite P. Natural history of HIV and AIDS. *Medicine*. 2018;46(6):356-361.
- [2] Gallo RC, Wong-Staal F. A Human T-Lymphotropic Retrovirus (HTLV-III) as the Cause of the Acquired Immunodeficiency Syndrome. *Ann Intern Med*. 1985; 103(5):679-689.
- [3] Désiré N, Cerutti L, *et al*. Characterization update of HIV-1 M subtypes diversity and proposal for subtypes A and D sub-subtypes reclassification. *Retrovirology*. 2018;15(1):80.
- [4] Eberle J, Gürtler L. HIV Types, Groups, Subtypes and Recombinant Forms: Errors in Replication, Selection Pressure and Quasispecies. *Intervirology*. 2012;55(2):79-83.
- [5] Zhu T, Korber BT, *et al*. An African HIV-1 sequence from 1959 and implications for the origin of the epidemic. *Nature*. 1998;391(6667):594-597.
- [6] Barré-Sinoussi F, Ross AL, *et al*. Past, present and future: 30 years of HIV research. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(12):877-883.
- [7] German Advisory Committee Blood (Arbeitskreis Blut), Subgroup 'Assessment of Pathogens Transmissible by Blood'. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemother*. 2016;43(3):203-222.
- [8] Teixeira C, Gomes JR, *et al*. Viral surface glycoproteins, gp120 and gp41, as potential drug targets against HIV-1: Brief overview one quarter of a century past the approval of zidovudine, the first antiretroviral drug. *Eur J Med Chem*. 2011;46(4):979-992.
- [9] Xiang SH. Recent Advances on the Use of Structural Biology for the Design of Novel Envelope Immunogens of HIV-1. *Curr HIV Res*. 2013;11(6):464-472.
- [10] Fanales-Belasio E, Raimondo M, *et al*. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita*. 2010;46(1):5-14.
- [11] Frankel AD, Young JA. HIV-1: Fifteen Proteins and an RNA. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:1-25.
- [12] Garcia JV, Miller AD. Serine phosphorylation-independent downregulation of cell-surface CD4 by nef. *Nature*. 1991;350(6318):508-511.
- [13] Willey RL, Maldarelli F, *et al*. Human immunodeficiency virus type 1 Vpu protein induces rapid degradation of CD4. *J Virol*. 1992;66(12):7193-7200.
- [14] Desai TM, Marin M, *et al*. Fluorescent protein-tagged Vpr dissociates from HIV-1 core after viral fusion and rapidly enters the cell nucleus. *Retrovirology*. 2015;12(88).
- [15] Marin M, Rose KM, *et al*. HIV-1 Vif protein binds the editing enzyme APOBEC3G and induces its degradation. *Nat Med*. 2003;9(11):1398-1403.
- [16] Laguette N, Sobhian B, *et al*. SAMHD1 is the dendritic and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx. *Nature*. 2011;474(7353):654-657.
- [17] Stebbing J, Gazzard B, *et al*. Where Does HIV Live?. *N Engl J Med*. 2004;350(18):1872-1880.
- [18] Kwong PD, Wyatt R, *et al*. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 1998;393(6686):648-659.
- [19] Simmons G, Wilkinson D, *et al*. Primary, syncytium-inducing human immunodeficiency virus type 1 isolates are dual-tropic and most can use either Lestr or CCR5 as coreceptors for virus entry. *J Virol*. 1996;70(12):8355-8360.
- [20] Qiu J, Liang T, *et al*. N-Substituted Pyrrole Derivative 12m Inhibits HIV-1 Entry by Targeting Gp41 of HIV-1 Envelope Glycoprotein. *Front Pharmacol*. 2019;10:859.
- [21] Cai L, Shi W, *et al*. Peptides and Peptidomimetics as Tools to Probe Protein-Protein Interactions – Disruption of HIV-1 gp41 Fusion Core and Fusion Inhibitor Design. In: Ekin D, editor. *Biochemistry*. Rijeka: InTech; 2012. p. 39-64.
- [22] Eckert DM, Kim PS. Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu Rev Biochem*. 2001;70:777-810.
- [23] Schröder AR, Shinn P, *et al*. HIV-1 integration in the human genome favors active genes and local hotspots. *Cell*. 2002;110(4):521-529.
- [24] Cantin R, Méthot S, *et al*. Plunder and stowaways: incorporation of cellular proteins by enveloped viruses. *J Virol*. 2005;79(11):6577-6587.
- [25] Engelman A, Cherepanov P. The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2012;10(4):279-290.
- [26] Pau AK, George JM. Antiretroviral therapy: current drugs. *Infect Dis Clin North Am*. 2014;28(3):371-402.
- [27] Lucas S, Nelson AM. HIV and the spectrum of human disease. *J Pathol*. 2015;235(2):229-241.
- [28] Autran B, Carcelain G, *et al*. Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapy on CD4⁺ T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease. *Science*. 1997;277(5322):112-116.
- [29] Prokofjeva MM, Kochetkov SN, *et al*. Therapy of HIV Infection: Current Approaches and Prospects. *Acta Naturae*. 2016;8(4):23-32.
- [30] Siliciano JD, Kajdas J, *et al*. Long-term follow-up studies confirm the stability of the latent reservoir for HIV-1 in resting CD4⁺ T cells. *Nat Med*. 2003;9(6):727-728.

- [31] Rasmussen TA, Tolstrup M, *et al.* Panobinostat, a histone deacetylase inhibitor, for latent-virus reactivation in HIV-infected patients on suppressive antiretroviral therapy: a phase 1/2, single group, clinical trial. *Lancet HIV*. 2014;1(1):e13-e21.
- [32] Cecchetti V, Parolin C, *et al.* 6-Aminoquinolones as New Potential Anti-HIV Agents. *J Med Chem*. 2000;43(20):3799-3802.
- [33] Menéndez-Arias L. Molecular basis of human immunodeficiency virus drug resistance: An update. *Antiviral Res*. 2010;85(1):210–231.
- [34] Qian K, Morris-Natschke SL, *et al.* HIV entry inhibitors and their potential in HIV therapy. *Med Res Rev*. 2009;29(2):369-393.
- [35] Malik T, Chauhan G, *et al.* Fusion and binding inhibition key target for HIV-1 treatment and pre-exposure prophylaxis: targets, drug delivery and nanotechnology approaches. *Drug Deliv*. 2017;24(1):608-621.
- [36] Haqqani AA, Tilton JC. Entry inhibitors and their use in the treatment of HIV-1 infection. *Antiviral Res*. 2013;98(2):158-170.
- [37] Jacobson JM, Israel RJ, *et al.* Treatment of advanced human immunodeficiency virus type 1 disease with the viral entry inhibitor PRO 542. *Antimicrob Agents Chemother*. 2004;48(2):423-429.
- [38] Gauduin MC, Allaway GP, *et al.* Effective ex vivo neutralization of human immunodeficiency virus type 1 in plasma by recombinant immunoglobulin molecules. *J Virol*. 1996;70(4):2586-2592.
- [39] Trkola A, Pomales AB, *et al.* Cross-clade neutralization of primary isolates of human immunodeficiency virus type 1 by human monoclonal antibodies and tetrameric CD4-IgG. *J Virol*. 1995;69(11):6609-6617.
- [40] Ho HT, Fan L, *et al.* Envelope Conformational Changes Induced by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Attachment Inhibitors Prevent CD4 Binding and Downstream Entry Events. *J Virol*. 2006;80(8):4017-4025.
- [41] Zhang Y, Chapman JH, *et al.* Neutralization Synergy between HIV-1 Attachment Inhibitor Fostemsavir and Anti-CD4 Binding Site Broadly Neutralizing Antibodies against HIV. *J Virol*. 2019;93:4.
- [42] Emu B, Fessel J, *et al.* Phase 3 Study of Ibalizumab for Multidrug-Resistant HIV-1. *N Engl J Med*. 2018;379(7):645-654.
- [43] Westby M, Van der Ryst E. CCR5 antagonists: host-targeted antivirals for the treatment of HIV infection. *Antivir Chem Chemother*. 2005;16(6):339-354.
- [44] Burger DR, Parker Y, *et al.* PRO 140 Monoclonal Antibody to CCR5 Prevents Acute Xenogeneic Graft-versus-Host Disease in NOD-scid IL-2Ry^{null} Mice. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2018;24(2):260-266.
- [45] Hendrix CW, Collier AC, *et al.* Safety, Pharmacokinetics, and Antiviral Activity of AMD3100, a Selective CXCR4 Receptor Inhibitor, in HIV-1 Infection. *J Acquir Immune Defic Syndr*. 2004;37(2):1253-1262.
- [46] Moyle G, DeJesus E, *et al.* Proof of Activity with AMD11070, an Orally Bioavailable Inhibitor of CXCR4-Tropic HIV Type 1. *Clin Infect Dis*. 2009;48(6):798-805.
- [47] Moore JP, Doms, RW. The entry of entry inhibitors: A fusion of science and medicine. *Proc Natl Acad Sci*. 2003;100(19):10598-10602.
- [48] Jenny-Avital ER. Enfuvirtide, an HIV-1 Fusion Inhibitor. *N Engl J Med*. 2003;349(18):1770-1771.
- [49] He Y, Xiao Y, *et al.* Design and Evaluation of Sifuvirtide, a Novel HIV-1 Fusion Inhibitor. *J Biol Chem*. 2008;283(17):11126-11134.
- [50] Cao P, Dou G, *et al.* The improved efficacy of Sifuvirtide compared with enfuvirtide might be related to its selectivity for the rigid biomembrane, as determined through surface plasmon resonance. *PLoS One*. 2017;12(2):e0171567.
- [51] Müller JA, Glöckle A, *et al.* Reduced Susceptibility to VIRIP-Based HIV-1 Entry Inhibitors Has a High Genetic Barrier and Severe Fitness Costs. *J Virol*. 2018;92:17.
- [52] Flores A, Quesada E. Entry Inhibitors Directed Towards Glycoprotein gp120: An Overview on a Promising Target for HIV-1 Therapy. *Curr Med Chem*. 2013;20(6):751-771.
- [53] Wu X, Wang C, *et al.* Selection Pressure on HIV-1 Envelope by Broadly Neutralizing Antibodies to the Conserved CD4-Binding Site. *J Virol*. 2012;86(10):5844-5856.
- [54] Labrijn AF, Poignard P, *et al.* Access of antibody molecules to the conserved coreceptor binding site on glycoprotein gp120 is sterically restricted on primary human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*. 2003;77(19):10557-10565.
- [55] Acharya P, Lusvardi S, *et al.* HIV-1 gp120 as a therapeutic target: Navigating a moving labyrinth. *Expert Opin Ther Targets*. 2015;19(6):765-783.
- [56] Kwong PD, Wyatt R, *et al.* Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 1998;393(6686):648-659.
- [57] Helseth E, Olshevsky U, *et al.* Human immunodeficiency virus type 1 gp120 envelope glycoprotein regions important for association with the gp41 transmembrane glycoprotein. *J Virol*. 1991;65(4):2119-2123.
- [58] Li Y, Deng L, *et al.* Effects of CD4 Binding on Conformational Dynamics, Molecular Motions, and Thermodynamics of HIV-1 gp120. *Int J Mol Sci*. 2019;20:2.

- [59] Pantophlet R, Burton DR. GP120: Target for Neutralizing HIV-1 Antibodies. *Annu Rev Immunol.* 2006; 24:739-769.
- [60] Guttman M, Kahn M, *et al.* Solution Structure, Conformational Dynamics, and CD4-Induced Activation in Full-Length, Glycosylated, Monomeric HIV gp120. *J Virol.* 2012, 86(16):8750-8764.
- [61] Rizzuto CD, Wyatt R, *et al.* A conserved HIV gp120 glycoprotein structure involved in chemokine receptor binding. *Science.* 1998;280(5371):1949-1953.
- [62] Wu X, Yang ZY, *et al.* Rational Design of Envelope Identifies Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to HIV-1. *Science.* 2010;329(5993):856-861.
- [63] Balla-Jhaghoorsingh SS, Corti D, *et al.* The N276 Glycosylation Site Is Required for HIV-1 Neutralization by the CD4 Binding Site Specific HJ16 Monoclonal Antibody. *PLoS One.* 2013;8(7): e68863.
- [64] Acharya P, Luongo TS, *et al.* Structural Basis for Highly Effective HIV-1 Neutralization by CD4-Mimetic Miniproteins Revealed by 1.5 Å Cocrystal Structure of gp120 and M48U1. *Structure.* 2013;21(6):1018-1029.
- [65] Zhao Q, Ma L, *et al.* Identification of N-phenyl-N'-(2,2,6,6-tetramethyl-piperidin-4-yl)-oxalamides as a new class of HIV-1 entry inhibitors that prevent gp120 binding to CD4. *Virology.* 2005;339(2):213-225.
- [66] Tran EE, Borgnia MJ, *et al.* Structural mechanism of trimeric HIV-1 envelope glycoprotein activation. *PLoS Pathog.* 2012;8(7):e1002797.
- [67] Julien JP, Lee JH, *et al.* Asymmetric recognition of the HIV-1 trimer by broadly neutralizing antibody PG9. *Proc Natl Acad Sci.* 2013;110(11):4351-4356.
- [68] Pancera M, Shahzad-UI-Hussan S, *et al.* Structural basis for diverse N-glycan recognition by HIV-1-neutralizing V1–V2-directed antibody PG16. *Nat Struct Mol Biol.* 2013;20(7):804-813.
- [69] Shingai M, Donau OK, *et al.* Passive transfer of modest titers of potent and broadly neutralizing anti-HIV monoclonal antibodies block SHIV infection in macaques. *J Exp Med.* 2014;211(10):2061-2074.
- [70] Halper-Stromberg A, Lu CL, *et al.* Broadly Neutralizing Antibodies and Viral Inducers Decrease Rebound from HIV-1 Latent Reservoirs in Humanized Mice. *Cell.* 2014;158(5):989-999.
- [71] Caskey M, Klein F, *et al.* Viraemia suppressed in HIV-1-infected humans by broadly neutralizing antibody 3BNC117. *Nature.* 2015;522(7557):487-491.
- [72] Burton DR, Advancing an HIV vaccine; advancing vaccinology. *Nat Rev Immunol.* 2019;19(2):77-78.
- [73] Awi NJ, Teow SY. Antibody-Mediated Therapy against HIV/AIDS: Where Are We Standing Now?. *J Pathog.* 2018;2018:8724549.
- [74] Ramana LN, Anand AR, *et al.* Targeting strategies for delivery of anti-HIV drugs. *J Control Release.* 2014;192:271-283.
- [75] Schroeder HW, Cavacini L. Structure and function of immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol.* 2010;125(2):S41-S52.
- [76] Ruigrok VJ, Levisson M, *et al.* Alternative affinity tools: more attractive than antibodies?. *Biochem J.* 2011;436(1):1-13.
- [77] Honjo T, Habu S. Origin of Immune Diversity: Genetic Variation and Selection. *Annu Rev Biochem.* 1985;54:803-830.
- [78] Market E, Papavasiliou FN. V(D)J Recombination and the Evolution of the Adaptive Immune System. *PLoS Biol.* 2003;1(1):E16.
- [79] Ecker DM, Jones SD, *et al.* The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs.* 2015;7(1):9-14.
- [80] Hu W, Nagata LP. Opportunities and Challenges of Therapeutic Monoclonal Antibodies as Medical Countermeasures for Biodefense. *J Bioterror Biodef.* 2016;7(3):1-6.
- [81] Jain RK. Physiological barriers to delivery of monoclonal antibodies and other macromolecules in tumors. *Cancer Res.* 1990;50(3):814s-819s.
- [82] Saerens D, Ghassabeh GH, *et al.* Single-domain antibodies as building blocks for novel therapeutics. *Curr Opin Pharmacol.* 2008;8(5):600-608.
- [83] Nelson AL. Antibody fragments: hope and hype. *MAbs.* 2010;2(1):77-83.
- [84] Aires da Silva F, Corte-Real S, *et al.* Recombinant Antibodies as Therapeutic Agents: pathways for modeling new biodrugs. *BioDrugs.* 2008;22(5):301-314.
- [85] Spadiut O, Capone S, *et al.* Microbials for the production of monoclonal antibodies and antibody fragments. *Trends Biotechnol.* 2014;32(1):54-60.
- [86] Cumber AJ, Ward ES, *et al.* Comparative stabilities in vitro and in vivo of a recombinant mouse antibody FvCys fragment and a bisFvCys conjugate. *J Immunol.* 1992;149(1):120-126.
- [87] Holt LJ, Basran A, *et al.* Anti-serum albumin domain antibodies for extending the half-lives of short lived drugs. *Protein Eng Des Sel.* 2008;21(5):283-288.
- [88] Jain A, Jain SK. PEGylation: an approach for drug delivery. A review. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* 2008;25(5):403-447.
- [89] Bates A, Power CA. David vs. Goliath: The Structure, Function, and Clinical Prospects of Antibody Fragments. *Antibodies.* 2019;8(2):E28

- [90] Nelson PN, Reynolds GM, *et al.* Monoclonal antibodies. *Mol Pathol.* 2000;53(3):111-117.
- [91] Sawler DL, Bartholomew RM, *et al.* Human immune response to multiple injections of murine monoclonal IgG. *J Immunol.* 1985;135(2):1530-1535.
- [92] Rossi S, Laurino L, *et al.* Rabbit Monoclonal Antibodies: A Comparative Study Between a Novel Category of Immunoreagents and the Corresponding Mouse Monoclonal Antibodies. *Am J Clin Pathol.* 2005;124(2):295-302.
- [93] Frenzel A, Schirrmann T, *et al.* Phage display-derived human antibodies in clinical development and therapy. *MAbs.* 2016;8(7):1177-1194.
- [94] Smith GP. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science.* 1985;228(4705):1315-1317.
- [95] Barderas R, Benito-Peña E. The 2018 Nobel Prize in Chemistry: phage display of peptides and antibodies. *Anal Bioanal Chem.* 2019;411(12):2475-2479.
- [96] Hammers CM, Stanley JR. Antibody Phage Display: Technique and Applications. *J Invest Dermatol.* 2014;134(2):1-5.
- [97] Persson MA, Caothien RH, *et al.* Generation of diverse high-affinity human monoclonal antibodies by repertoire cloning. *Proc Natl Acad Sci.* 1991;88(6):2432-2436.
- [98] Berry JD, Popkov M. Antibody libraries from immunized repertoires. In: Sidhu SS, Geyer CR, editors. *Phage display in biotechnology and drug discovery.* New York: CRC Press; 2005. p. 529-657.
- [99] Dobson CL, Minter RR, *et al.* Naive antibody libraries from natural repertoires. In: Sidhu SS, Geyer CR, editors. *Phage display in biotechnology and drug discovery.* New York: CRC Press; 2005. p. 659-707.
- [100] Fellouse FA, Sidhu SS. Synthetic antibody libraries. In: Sidhu SS, Geyer CR, editors. *Phage display in biotechnology and drug discovery.* New York: CRC Press; 2005. p. 709-740.
- [101] Fantini M, Pandolfini L, *et al.* Assessment of antibody library diversity through next generation sequencing and technical error compensation. *PLoS One.* 2017;12(5): e0177574.
- [102] Levisson M, Spruijt RB, *et al.* Phage Display of Engineered Binding Proteins. *Methods Mol Biol.* 2014;1129:211-229.
- [103] Barbas III CF, Burton DR, *et al.* *Phage Display: A Laboratory Manual.* New York: CSHL Press; 2004.
- [104] Mimmi S, Maisano D, *et al.* Phage Display: An Overview in Context to Drug Discovery. *Trends Pharmacol Sci.* 2019;40(2):87-91.
- [105] Delhalle S, Schmit J, *et al.* Phages and HIV-1 : From Display to Interplay. *Int J Mol Sci.* 2012;13(4):4727-4794.
- [106] Lopes RS, Queiroz MAF, *et al.* Phage display: an important tool in the discovery of peptides with anti-HIV activity. *Biotechnol Adv.* 2018;36(7):1847-1854.
- [107] Cunha-Santos C, Figueira TN, *et al.* Development of synthetic light-chain antibodies as novel and potent HIV fusion inhibitors. *AIDS.* 2016;30(11):1691-1701.
- [108] Calado R. Development and pre-clinical evaluation of a new HIV-1 vaccine concept. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2018.
- [109] Hussack G, Keklikian A, *et al.* A VL single-domain antibody library shows a high-propensity to yield non-aggregating binders. *Protein Eng Des Sel.* 2012;25(6):313-318.
- [110] Kabat E, Wu A, *et al.* Sequences of proteins of immunological interest. 5th ed. Bethesda: NIH Publication; 1991.
- [111] Marques FC. Development of specific recombinant single-domain antibodies against gp120 HIV-1 glycoprotein and their selection by Phage Display. Lisboa: Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa; 2018.

6. Material Suplementar

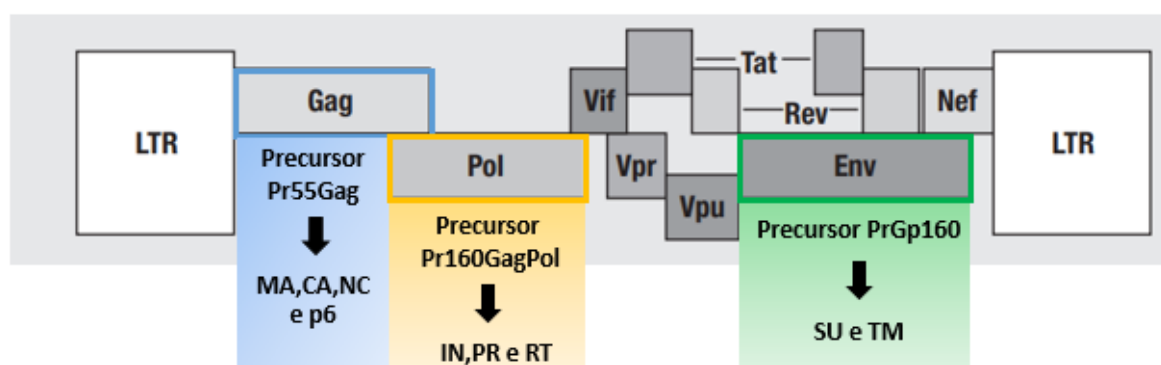


Figura Suplementar 6.1 – Representação esquemática do genoma e proteoma do VIH-1 (adaptado de [10]).

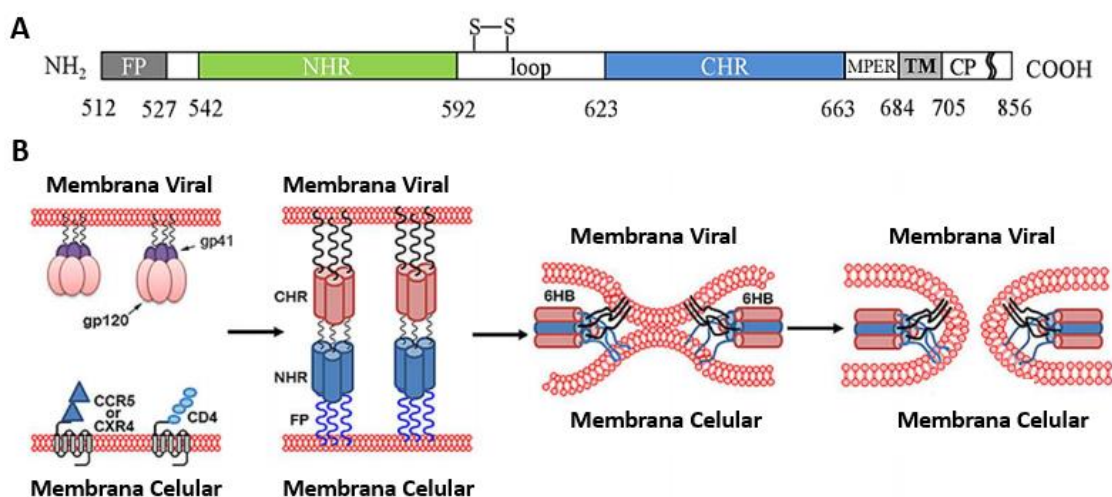


Figura Suplementar 6.2 – A) Representação esquemática dos domínios constituintes da glicoproteína gp41 (FP- Péptido de fusão; NHR- *N-terminal Heptad Repeat*; CHR- *C-terminal Heptad Repeat*; MPER- *Membrane Proximal Ectodomain Region*; TM- Domínio Transmembranar e CP- Domínio Citoplasmático (adaptado de [20]). B) Esquema representativo do processo de fusão entre a membrana viral e a membrana da célula alvo. As alterações conformacionais na gp41 traduzem-se na inserção do péptido de fusão na membrana da célula alvo e emparelhamento das regiões NHR e CHR, originando uma estrutura designada *six Helix-Bundle* (6HB) que permite a aproximação entre a membrana viral e celular e consequente fusão (adaptado de [21]).

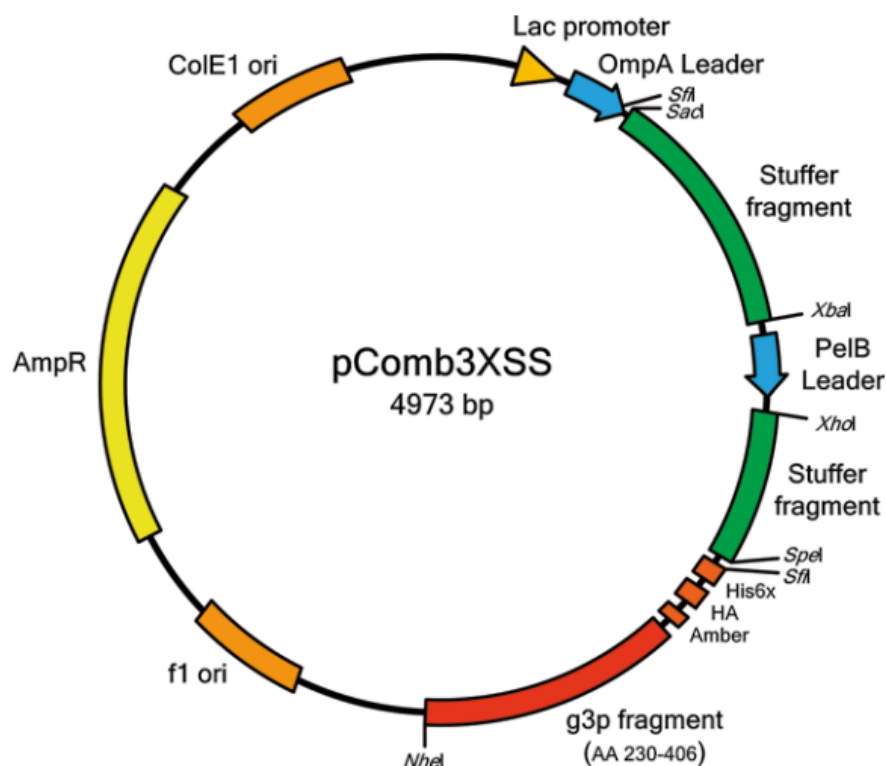


Figura Suplementar 6.3– Detalhes do vetor fagemídeo pComb3X-SS (f1 ori- origem de replicação do fago; AmpR- gene de resistência à ampicilina; ColE1- origem de replicação de *E.coli*; OmpA Leader- facilita o transporte da proteína de fusão para o periplasma; SfiI, SacI, SpeI, NheI, XbaI e XhoI- locais de reconhecimento de enzimas de restrição; Stuffer Fragments- regiões limitadas por sítios de reconhecimento de enzimas de restrição e que podem ser removidas para que os genes de interesse possam ser clonados; Marcadores His6x e HA – utilizados em purificação e detecção de proteínas recombinantes; Codão Amber- usado para desligar a expressão da proteína pIII; g3p fragment- fragmento C-terminal da proteína de revestimento pIII (adaptado de [102]).

Tabela Suplementar 6.1 – Primers *forward* e *reverse* usados na primeira ronda de PCR para amplificação das diferentes famílias dos domínios VH.

Primer	Sequência
RSCVH1	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CAG TCG GTG GAG GAG TCC RGG 3'
RSCVH2	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CAG TCG GTG AAG GAG TCC GAG 3'
RSCVH3	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CAG TCG YTG GAG GAG TCC GGG 3'
RSCVH4	5' GGT GGT TCC TCT AGA TCT TCC CAG SAG CAG CTG RTG GAG TCC GG 3'
RSCVG-B	5' CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TGA CTG AYG GAG CCT TAG GTT GCC C 3'

Tabela Suplementar 6.2 – Primers *forward* e *reverse* usados na primeira ronda de PCR para amplificação das diferentes famílias dos domínios VL.

Primer	Sequência
RSCVK1	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGM TGA CCC AGA CTC CA 3'
RSCVK2	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG ATM TGA CCC AGA CTC CA 3'
RSCVK3	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGA TGA CCC AGA CTG AA 3'
RKB9J10-BL	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TAG GAT CTC CAG CTC GGT CCC 3'
RKB9J0-BL	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TAG GAT CTC CAG CTC GGT CCC 3'
RKB42J0-BL	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA TTT GAC SAC CAC CTC GGT CCC 3'
RSCλ1	5' GGG CCC AGG CGG CCG AGC TCG TGC TGA CTC AGT CGC CCT C 3'
RJλ0-BL	5' GGA AGA TCT AGA GGA ACC ACC CCC ACC ACC GCC CGA GCC ACC GCC ACC AGA GGA GCC TGT GAC GGT CAG CTG GGT CCC 3'

Tabela Suplementar 6.3 – Primers *forward* e *reverse* usados na segunda ronda de PCR.

Primer	Sequência
RSC-F	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG GCG GGG CCC AGG CGG CCG AGC TC 3'
RSC-B	5' GAG GAG GAG GAG GAG GAG CCT GGC CGG CCT GGC CAC TAG TG 3'

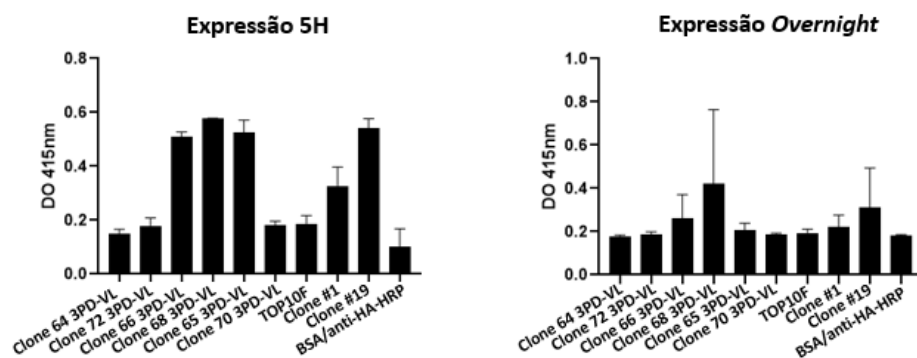


Figura Suplementar 6.4 - Expressão dos diferentes clones a uma temperatura de indução de 19°C. O extrato celular de TOP10F foi utilizado como controlo negativo. Os clones #1 e #19 são clones cujo padrão de expressão a 19°C já era conhecido e, por isso, funcionaram como controlos positivos. BSA/anti-HA-HRP forneceu informações sobre a inespecificidade das ligações. Os valores apresentados representam a média \pm desvio padrão de ensaios em duplicado para cada condição e onde foram obtidos resultados semelhantes.